目　录

第一章　绪论……（1）
第二章　多糖生物化学……（8）
　第一节　多糖的分类及功能……（8）
　第二节　多糖的结构及构象分析……（10）
　第三节　几种常见的多糖……（13）
　第四节　多糖物质的分离和分析……（29）
　第五节　多糖的抗肿瘤活性及药用功能……（64）
　主要参考文献……（68）
第三章　蛋白质化学……（70）
　第一节　蛋白质的功能、分类及蛋白质工程……（70）
　第二节　氨基酸的功能、结构、性质……（75）
　第三节　蛋白质的性质……（84）
　第四节　蛋白质的结构分析……（94）
　第五节　其他若干问题……（97）
　主要参考文献……（105）
第四章　酶化学……（107）
　第一节　酶的含义、特点、分类、命名、结构……（107）
　第二节　酶的分离与提纯……（117）
　第三节　酶活力测定及酶促反应动力学……（120）
　第四节　固定化酶……（133）
　第五节　酶的重要应用……（145）
　主要参考文献……（152）
第五章　核酸化学……（153）
　第一节　核酸是遗传物质……（153）
　第二节　碱基、核苷和核苷酸……（157）
　第三节　核酸的结构、功能、性质及分离……（161）
　第四节　病毒的结构、功能及DNA突变……（181）
　第五节　基因工程简介……（183）
　主要参考文献……（186）
跋：生物高分子结构和功能的几个共性……（187）

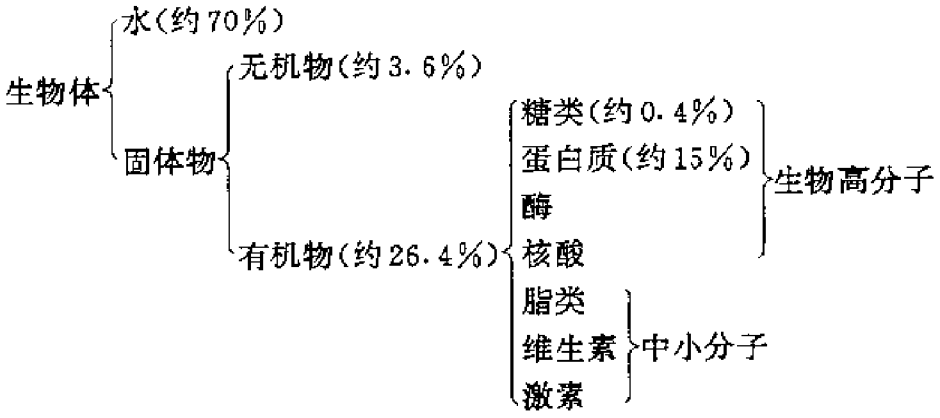
第一章　绪　论

一、生物高分子与生物化学

生物化学即生命的化学，属交叉学科，主要研究生物机体的化学组成和生命过程的化学变化规律，即利用化学的理论和方法研究生命现象。生命现象包括生长、发育、遗传、变异、感觉、运动、记忆、衰老、死亡等。生命的基本特征是新陈代谢。新陈代谢包括物质代谢（分解与合成）和能量代谢（供能与产能）。新陈代谢有五大特点：(1)严格的细胞内定位关系，(2)特异的酶促反应，(3)共通的代谢关联，(4)严谨的反应序列，(5)高效率的调控机构。

高分子物质分为合成高分子物质（如：塑料、橡胶和合成纤维三大合成材料）和天然高分子物质两大类。生物高分子物质是天然高分子物质中比较特殊的一类，它是生物体内的高分子。

生物体内存在的物质主要有：



生物高分子所讨论的是多糖、蛋白质、酶、核酸的结构、性质、功能及研究方法等，属于生物化学学科体系。

生物化学近几年来取得了突飞猛进的发展，这一方面当然是客观世界的要求和可能因素的作用，另一方面也与生物化学这门学科的特点有关。它是社会的需要以及社会提供的可能的客观条件的综合结果，另外，也体现了“杂交优势”这种生物学现象。交叉学科具有强大无比的生命力，也具有特殊的优势。

二、生物化学的发展

生物化学源于有机化学和生理学。它于18世纪萌芽，19世纪初步发展，20世纪初独立

为一门学科。该学科最初被称为"生理化学",1903年德国的Carl Neuberg(1877—1956)初次使用"Biochemistry"(生物化学)这一名词,标志生物化学作为独立学科的诞生。

生物化学的发展,首先起源于法国,由法国传入德国,再由德国传到美国和英国,20世纪时由上述国家传到世界各国。

20世纪30年代,生化界的研究热点主要集中在对激素和各种维生素的分离和鉴定以及对人体功能和氨基酸的分离方面。福建师范大学化学系的首任主任余宝笙教授1935年在美国约翰斯霍普金斯大学攻读博士学位时,就曾师从于维生素A、B、C的发现者麦卡伦教授。美国的JamesB. Summer(1877—1955)是世界上第一个得到脲酶结晶的人(1946年,J. B. Summer和另两位美国学者J. H. Northrop和W. M. Stanley分享了诺贝尔化学奖,后两位也是从事纯净状态的酶和病毒蛋白质研究的专家)。还有HansA. Krebs提出了著名的三羧酸循环,使糖、脂肪、蛋白质及氨基酸的代谢途径得到阐明。Otto Meyerthof(1884—1951)和Otto Wargburg(1883—1970)则提出了ATP是代谢能产生和利用的关键物质,提出了呼吸链及氧化磷酸化的理论,从而建立了生物能量学(bioenergetics)这一分支学科。Michaelis-Menten等开展了酶反应动力学的研究,建立了具有普遍意义的米氏方程,使生物化学进入更成熟的阶段。随后便出现了生物物理化学、生物无机化学、生物有机化学、生物分析化学、生物化工等一系列更具体实用的分支。

20世纪50年代以来,生物大分子的结构和功能的研究进入飞跃发展时期。Pauling等人根据X射线的研究,提出了蛋白质的二级结构,特别是蛋白质的α-螺旋结构的提出,促进了生物高分子结构研究的发展。1954年,Pauling因阐明化学键的本质以及解释复杂分子结构而获诺贝尔化学奖;1953年,Sanger因测定了胰岛素分子的一级结构,而于1958年获诺贝尔化学奖;1953年,James D. Watson和Francis H. C. Crick提出了DNA双螺旋结构,此被认为是分子生物学的第一定律。其他方面,如生物高分子三维结构、遗传密码、生物信息传递的中心法则及1961年乳糖操纵子——基因的表达调控等的阐明,都标志着生物化学进入了一个崭新的发展时期,从而使生命科学里的带头学科——分子生物学迅速兴起。该学科就是从生物高分子(蛋白质、酶、核酸、多糖)的水平上研究生命现象的一门科学。

更令人振奋的是在20世纪即将结束之际,继1997年英国维而穆特向世界宣告克隆羊多利诞生之后不到3年,2000年6月26日下午6时,美、英、日、德、法、中六国同时向世人宣布,人类历史上最伟大的科学工程——人类基因组的"工作草图"宣告绘制完成。这项历时10年,耗资30多亿美元,号称是继曼哈顿原子弹计划(1941—1943,耗资20亿美元)和阿波罗登月计划(耗资300亿美元,1969年7月20日登月)之后的人类第三大计划的完成,将给人类带来根本性变化。人类不断完善的进化速度将大大加快,与人类相关的各种疾病,以及衰老、死亡等均可得到预测、预防和早期诊断、治疗。有人预计由此派生出的产业年产值可达450亿美元,"基因经济"一触即发。

生物高分子领域取得如此突飞猛进的发展,一方面体现了交叉学科的优势。近30年来,在细胞学、免疫学、生理学、生物化学及生物物理学各领域都取得了迅速发展,特别是现代数学、物理学、化学等方面的新概念和新技术大量渗入到生物学科中,生物科学的研究重点逐渐由细胞水平转向分子水平。另一方面,也是社会客观需要和客观条件可能的综合结果,例如"巴氏消毒法"(目前仍用于酒、牛奶的消毒方法)的产生。1865年法国立耳城制酒坊里本

来芬芳的啤酒变酸，巴斯德借用显微镜找出了原因——乳酸杆菌，接着他采用65 ℃左右保温30分钟的办法，消灭了乳酸杆菌。当时不少酒店老板还半信半疑，并配制了一系列的啤酒，当场请巴斯德试验、品尝，结果无不信服之。还有其他如卡介苗、牛痘、黄胺药物、青霉素等问世也有类似情况。正是社会的迫切需要，才使这些药品问世，并服务于人类。当前人类迫切要求的是：病毒控制、癌症控制、环境污染控制、衰老控制、记忆长青以及粮食生产方面的优良品种培育、光合效率提高、病虫害防治技术等。而当前客观条件也提供了这种可能，如创新的仪器层出不穷（如核酸、蛋白合成仪、分析仪的问世，更精密、微量的分析仪的产生）、创新技术（如基因工程技术、分子杂交技术）以及创新的思维方法、理论等日新月异，可以乐观地估计，在未来30年内，生物高分子学科必将硕果累累，全方位地服务于人类。

三、中国的生物化学

在中国，生物化学成为一门独立学科较国外迟20年至30年，但也有不少令人振奋和世界一流的成就。

20世纪30年代，我国生化学家吴宪（1893—1958，福州人）提出的蛋白质变性学说，至今仍为世界各国学者沿用。1931年吴宪指出，蛋白质的变性就是它的肽链从卷曲变到伸展的过程，后来的工作都证明吴宪的说法是正确的。当然从现代主体结构角度可以确切地说，蛋白质的变性是它的高级结构被破坏，而一级结构不遭破坏导致生物学功能丧失的过程。这与吴宪的说法在本质上是一致的。

1965年，我国生化专家在世界上首次人工合成了具有生物活性的蛋白质——牛胰岛素，这是一个含有51个氨基酸残基的小蛋白，主要用于治疗糖尿病。1981年，我国生化工作者又在世界上首次合成核糖核酸——酵母丙氨酸转移核糖核酸（一个含41个核苷酸的tRNA），为天然核酸的人工合成打开了一条通路。这两项为我国赢得世界荣誉、载入史册成就的课题倡议人、负责人之一王应睐教授（1907—2001，福建金门人）为此付出了不少心血。

另外，近20年来，我国生化领域的一些成就也是不胜枚举：

1. 基因工程药物

乙型肝炎表面抗原基因工程疫苗是20世纪90年代生物技术头号攻关任务，进入中试后并完成了二期临床，1990年底形成100万人份的生产能力。人生长激素基因分别在大肠杆菌和哺乳动物细胞得到高表达，前者表达产物分布在细胞周质，易于分离提取，表达产物占菌体总蛋白的6%；后者在CHO细胞的表达产率达100 μg/(10^5 细胞 · 24 h），达到国际先进水平。幼畜腹泻基因工程疫苗的中试正顺利取得进展，工程菌的高密度发酵有突破，从20 L发酵液中便可获得与常规1 t发酵相抵的产量，仔猪免疫试验效果良好。

2. 蛋白质工程

该领域涉及三大基础学科，即蛋白质空间结构、蛋白质化学及基因工程。科学院在这三方面拥有综合优势。在国家高技术计划中，枯草杆菌蛋白酶、胰岛素、天花粉蛋白、葡糖异构酶、凝乳酶和蛋白酶抑制剂等被列为第一批定位突变的靶分子，其中枯草杆菌蛋白酶E的定位突变进展较快，Asn-218-Ser突变型酶稳定性提高了3倍，Met-222-Ala突变型酶抗氧化能力明显增强。

3. 转基因动物

该技术的目的之一是改善动物的生产性能，如提高生长速率、改善肉质等。据知已初步获得转入生长激素基因的鲤鱼、团头鲂、金鱼和泥鳅等，其生长速率普遍提高。当然要获得遗传上稳定的、有经济价值的品种，还有相当长的路要走。人类对转基因动物的另一个兴趣是把动物个体当成生物反应器，借以从动物的体液及组织中分离外源基因的表达产物。最近，我国科学家已成功地将HBsAg及hGH基因导入家兔受精卵中，并证实这些基因已整合到家兔染色体基因组内，能传代和表达，从而使以动物个体作为生物反应器的设想得到了证实。

4. 转基因植物

我国科学家周光宇等人曾通过花粉管通道注入外源总DNA获得抗枯萎病的棉花，经过10代的观察筛选已获得遗传稳定的品系，现已推广种植1333公顷。近几年，在体外重组的基础上又先后获得抗TMV、抗CMV烟草，抗除莠剂大豆及抗CMV番茄工程植株，其中有的即将进入大田试验。总之，转基因植物近年的进展超过原来的预想，为今后的农业应用打下了良好基础。

5. 单克隆抗体

我国先后研究成功抗人绒毛膜促性腺激素(HCG)单抗及抗A、抗B人红细胞单抗，并制成定型临床诊断试剂盒。前者用于妇女妊娠检查，后两者则用于人血型鉴定，都具有快速、灵敏、准确等优点。在免疫毒素方面也有可喜进展：如天花粉蛋白(TCS)与抗肝癌单抗(Hepama-1)偶联，所得到的免疫毒素(TCS-Hepama-1)在裸鼠体内实验中，对肝癌细胞有强烈而专一的杀伤作用。

6. 动物细胞工程

继乳牛胚胎二分胚分割与移植成功之后，以黄牛为受体的移植也获成功，从而使受体范围扩大。最近四分胚再获成功，这一技术推广后将大大加快良种乳牛的增殖速度。在经济鱼类育种方面，采用单倍体育种和性别控制技术成功培养出全雌性杂交鲤鱼。由于雌鱼的长势在头一年里明显高于雄鱼(快30%)，所以当年便可以上市。近两年已推广130多公顷水面，受到生产者的欢迎。另外，以移植技术把鲤鱼核移入鲫鱼的去核卵中，育成鲤鲫核质杂交鱼，其无论在生长速率，还是在鱼肉品质都明显优于亲本，已推广1800多公顷水面，获得良好的经济效益。

7. 植物细胞和组织培养

在技术及应用两方面我国均拥有一定优势。如用茎尖培养所获得的马铃薯种薯已推广二三十万公顷，以每公顷增产3 750 kg计，经济效益已超过亿元。又如近年我国已引进优良香蕉品种，采用工厂化育苗进行良种繁育，已形成450万株试管苗的生产能力，推广良种后每公顷增产9 000 kg，而且已进入日本和港澳市场。此外，木薯的快繁技术、唐菖蒲的无病毒快繁技术等也获成功。“七五”期间我国原生质体再生植株的研究获大面积丰收，已先后实现了大豆、玉米、小麦、水稻、高粱、小米等重要农作物的原生质再生植株，使我国在这一领域继续处于世界领先地位，为细胞工程和遗传工程育种创造了良好条件。

8. 酶工程

在成功构建青霉素酰化酶基因工程菌之后，随之进入中试，并于1988年通过鉴定，这是

我国第一个完成中试的基因工程菌。最近固定化细胞反应器的研究又获良好进展，较明显地提高了 6-APA 的产率。在同一期间胞外青霉素酰化酶的研究也颇见成效，酶产量达 619 u/100 mL，并于1989 年通过中试鉴定。以上各项技术推广之后将可以使6-APA 的生产国产化，节约大量外汇。此外，在临床诊断用酶盒方面，部分酶盒已进入市场，更多的新型及热稳定的酶盒正陆续从实验室推出。

9. 发酵工程

在众多的成果中，以维生素C 二步法发酵生产技术比较突出。第一步发酵依然沿用原来的工艺，即黑醋菌催化*D*-山梨醇转化为梨糖。第二步则采用大小菌落混菌发酵生产2-酮基古龙酸。该工艺具有降低成本、减少污染、简化工艺等优点。该成果以 550 万美元转让给瑞士 Roche 公司，是建国以来最大的一宗技术转让项目。

以上简要介绍了我国近 20 年来生化领域的最新进展和部分成果，的确给我们带来很大的鼓舞和刺激。我们这一代人正在享受和将要享受基因工程的硕果带给我们的好处。通过以上介绍，我们也可以看到，生物高分子的研究和发展是多方面的，几乎涉及自然科学领域的 1/3。生物化学根据对象不同又常细分为植物生化、动物生化、微生物生化；根据应用不同，又分为工业生化、食品生化、农业生化、医学生化等。

四、生物化学与生产实践

1. 生物化学制品的应用

这一方面最主要的无疑是酶制剂的应用。酶制剂既可用于工农业产品的加工生产和改造，也可用来进行某些工艺的革新，还能用来处理“三废”。在医药实践上酶制剂的作用包括：帮助消化、消炎、治疗各种内外科疾患以及抗肿瘤等。固定化酶的开发还为制备“人工脏器”以取代功能衰竭的器官组织开辟了广阔的前景，同时也可能为先天性遗传病患者带来福音。

另一类生化制品是药物，如各种疫苗制品、血液制品、激素、维生素、核苷酸、氨基酸和它们的衍生物，以及某些蛋白质制剂等，此外还有某些抗代谢药物等。它们已广泛用于临床实践，起着十分重要的作用。

第三类是各种食品添加剂，包括通过抽提、发酵或者人工合成得到的甜味剂等，也包括各种营养补剂，还包括某些饲料添加剂等。

最后一类是生化制剂，如各种酶制剂、核酸、蛋白质试剂等，尤其是近年来发展极为迅速、层出不穷的为各种分子生物学、生物工程(学)研究所用的各种生化制剂，它们对近年来生物科学取得巨大进展做出了重要贡献；此外，还有各种临床检验的试剂盒等。

2. 生化分析和生化技术的应用

实际上生化分析现在已成为工农业生产和临床医学实践中常规的工作内容。对生产来说，生化分析不仅是产品质量的检验手段，也能指导生产、改造工艺过程，有助于提高产品的产量和质量。生化分析对于医学实践的意义是：辅助临床诊断，跟踪和指导治疗过程，并可能为探讨疾病产生机制提供某些线索。

生化分析中一个十分重要的内容是酶分析。酶分析包括两类：以酶为分析对象的分析和以酶为分析工具(或试剂)的分析。

值得指出的是，生化分析现在已不限于对组成成分的定量测定，也包括应用层析、电泳

等各种技术进行的组成定性分析。

至于所谓的生化技术的应用，包括生化分离纯化技术的应用、生物合成技术（包括肽合成和DNA 合成技术）的应用。它们是推动近代生物化学，特别是分子生物学发展的强有力的工具。这些技术近年来进展十分迅速，并且已经达到极高的水平，各种层析技术和层析介质、各种合成仪和合成方法及试剂层出不穷、日新月异。现在的任务是如何将这些成就推向生产。

最后值得提到的是，在生化应用技术中还应包括酶法（特别是固定化酶）与化学法相结合的工艺技术，它现在已在生产中逐渐推广应用，并已显示出很大的优越性。

3. "生化知识"的应用

"生化知识"在生产实践中可以发挥两方面的作用：促进生产、提高产量；指导药物设计，制造出杀灭病虫害的专一有效药物。

在工业生产，特别是发酵工业上，如果人们能掌握产品的代谢规律，尤其是它的代谢调节规律，那么人们就可能通过控制生产条件，或者通过遗传手段改造生物，突破其限制环节的调控，使所需的产品产量大幅度提高。现在氨基酸的生产在这方面有许多出色的例证。

在医学和农业上，首先，人们可针对病虫害代谢上的特点，特别是代谢的关键环节，设计强有力的抑制药物或抗代谢药物，以破坏病虫害的正常代谢，促使其死亡；其次，人们可根据病虫害与正常机体在酶谱和代谢上的差异，在原来的强力药物上装上"导弹"，或设计出新的具有高选择性的药物，保证在杀灭病虫害的同时不致损伤正常机体；第三，药物长期使用后会产生抗药性，其主要原因是由于药物诱导了分解它的酶的合成，因此在了解药物的代谢规律后，人们可针对性地对药物进行改造，克服抗药性，使药效增强、延长。

"生化知识"还可能为农业做出重要贡献。例如对光合作用机制的深刻认识，将有助于解决提高辐射能的利用和CO_2的固定问题；生物固氮是近年来生物科学研究的热点之一，如果能解决主要作物的固氮，那么将会使农作物的产量大大提高、质量大大改善。

除此之外，"生化知识"还可能指导农副产品的贮藏和加工，保证产品免受损失，提高产品的质量。

生物化学的形成源于生产实践，而它近年来的迅速进步又反过来有力地推动了生产实践的发展，可以这样说，生物化学已进入了人们生活和生产的各个领域。

五、分子生物学与生物工程学

分子生物学是一门从分子水平研究生命过程的科学。具体地说，它是要从生物大分子，包括核酸、蛋白质、酶，也包括生物膜的结构、性质与功能的关系去阐明生物学的一些基本问题，诸如遗传变异、细胞分化、生物进化、肿瘤、免疫等。由于这些问题极为复杂，需要多种学科、多种技术的协同配合，因此分子生物学是一门边缘科学，但是生物化学是其基础和核心。由于遗传学近年来的迅速发展，已经逐渐清楚上述生物学基本问题都最终地和遗传相关，遗传成了分子生物学要研究的中心问题。也有人简单地将分子生物学定义为遗传学和生物化学相结合的科学。这种狭义的分子生物学，或者称为分子遗传学，主要研究遗传物质（核酸）的复制、转录、表达、调控以及和其他生命现象的关系。它实际上是广义分子生物学的重要组成部分，也是最核心的部分。

生物工程(学)或称生物技术(学)是在分子生物学基础上发展起来的新兴技术学科(或者说新兴的技术体系),它的最终目的就是要利用最新的生物科学成就,定向设计组建具有特定性状的新物种、新品系,结合发酵和生化工程的原理,进行生物材料的生产和加工,以满足人们生活和生产的需要。生物工程(学)包括5个方面:基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程和生化工程。其中基因工程是整个生物工程的核心。由于生物工程(学)将给人类的生产和生活带来巨大而深远的影响,人们认为它是下一代新兴产业的基础技术之一。但是,不言而喻,生物工程(学)的发展依赖于其他学科,特别是分子生物学、生物化学的进步和支持。正因为如此,对将要投身这一领域的科技工作者来说,深入学习和了解生物化学、分子生物学的基本原理、基础知识和基础研究方法不无裨益。

第二章　多糖生物化学

【本章要点】

一　多糖的分类和功能
二　多糖的结构及构象分析
三　几种常见的多糖
四　多糖物质的分离和分析
五　多糖的抗肿瘤活性及其药用功能

第一节　多糖的分类及功能

多糖是一类十分重要的生物高分子，是由许多单糖单位缩合、失水而连接起来的均聚物或共聚物。糖类的生物化学有别于糖化学，它是从生物化学角度研究多糖。多糖的生物化学是在糖化学基础上展开的。糖化学的基础在一般有机化学教材中均已介绍，在此不再重复。糖类是自然界分布最广、含量最多的有机化合物，也是自然界中分子结构复杂而且品系庞大的一类。它们与蛋白质、核酸、酶是生物体内最重要的四大家族。

一、多糖的分类

多糖
- 单纯多糖（“单质”）
  - 匀多糖：淀粉、纤维素、糖原、甲壳质
  - 杂多糖：Sephadex、Sepharose、HA、硫酸软骨素果胶、琼脂、肝素
- 复合多糖（“复合物”）：
  - 糖肽类：肽聚糖、糖蛋白、蛋白聚糖
  - 糖脂类：脂多糖、糖鞘脂、糖基酰基甘油
  - 其他：核糖体

二、多糖的通性及功能

（1）构成植物和动物骨架的材料：如植物的纤维素是细胞壁成分，线性的均多糖几丁质则是节肢动物的结构成分。

（2）能源和碳源：多糖是各种生物能量的主要来源，这一点为人们所熟知。如“动物淀粉”——糖原在机体一旦需要时，即可通过生物体的酶系统作用而分解出单糖，进入代谢循环，产生能量，避免“低血糖”。多糖在体内通过代谢产生小分子碳物质，为合成大分子提供碳骨架来源。

（3）通过单糖间的糖苷键连接成生物大分子，有旋光性，但无变旋现象（这一点与单糖不

同），无甜味，无还原性，在水溶液中不能形成真溶液，只能形成胶体。

（4）生理功能，多糖分子作为接受信号的“天线”，在保证活性分子运往靶部位的过程中起着重要的作用。另外，还有人提出糖类成分能帮助糖蛋白延长活性寿命，稳定活性多肽三维空间结构，保护其蛋白质部分免遭其他酶类的攻击，或两者都有等。

多糖作为带有抗原的特殊免疫信息，是一种免疫促进剂，对防治肿瘤、肝炎和心血管疾病等都是有希望的药物。

生物导弹：有人把可能用于治疗肿瘤的免疫毒素称为生物导弹。就词义而言，生物导弹似乎有更广泛的含义，它可理解为能专一地作用于特定靶位，并进而产生特定生物效应的装置，其中“弹头”是产生生物效应的分子，而起专一结合作用的分子则是“导航”装置（“导航”装置主要是多糖类分子所为）。

三、糖类研究今昔——老兵新传

19世纪末至20世纪初，德国化学家Emil Fischer就对糖类进行了开拓性的研究，就此而言，糖类和脂类的研究是同龄的。但由于蛋白质与很多的生物功能有关，蛋白质和多肽的研究在以后的几十年中是稳定和持续的，而糖类研究却出现过低谷，甚至在20世纪50年代以后为迅速崛起的核酸的研究抛在后面。出现这种情况的原因主要是人们认为糖类的结构复杂，而功能又显得非常单调。在20世纪30年代糖类的研究也曾有过辉煌的一页：糖类作为能量的来源以及与此有关的糖酵解是当时颇受重视的研究课题，同时也发现了一些多糖（粘多糖）在生物体内起到重要的结构支持作用。但有些科学家认为糖类的研究仅此而已，他们也就转向其他领域。

但是，在受到近20年的冷遇后，20世纪60年代生物学和生化研究中的一些重大的进展使人们对糖类有了新的认识。在近20年中，糖类研究再次引起了人们的兴趣，与此同时，分离分析技术的发展，也为对糖类的检测和结构分析提供了有效的手段，为此糖类的研究取得了长足的进步，致使糖类这些“老兵”在生物学与生化飞快发展的年代中也谱写了新的传记。这主要表现在：

1. 糖类新的类型和结构的发现

在20世纪30年代，已知的单糖仅20余种，而就目前所知的单糖已超过100种，而且与它们相应的核苷酸衍生物很多也被发现，还有含糖的抗菌素的数目也与日俱增，新发现的糖蛋白的数目更是不胜枚举。动物血清中的糖蛋白有上百种，仅10余种是不含糖的简单蛋白。

以前人们注意的糖蛋白，或是在体液中，或是在细胞的表面（细胞壁和细胞质膜），最近几年却发现在细胞核内、细胞浆中也都有糖蛋白。同样，蛋白聚糖也不仅存在于细胞间质中，也发现于细胞质膜，乃至细胞浆和细胞核中。另外，有些成熟的蛋白质并不含糖，但它们的前体是糖蛋白。

2. 糖类在生物体内的功能新发现

糖蛋白中的糖链可以改变蛋白质的溶解度，增加蛋白质的亲水性和水合度，进而影响它们的形态，提高蛋白质对热和被蛋白酶水解的稳定性。

有些蛋白质的功能和糖部分密切相关，失去糖基，蛋白质的活性改变或失活。糖类还是蛋白质、核酸以外的又一类重要信息分子，很多糖类具有抗原性，它们是人的血型、细胞和许

多微生物分类的分子基础。

植物和有些植物病原体细胞壁的多糖长期以来都被认为仅起到结构支持作用，但近年也发现有些结构多糖的降解碎片，被称为寡糖素，是一类新的植物调节分子。它们可以作为信息分子诱导植物基因表达，产生与抗病有关的小分子和蛋白质，也能影响体外培养的植物组织的分化和形态发生。

糖领域还有很多问题有待回答：

首先是糖类的生物合成还是模糊的，仅知它们的合成与蛋白质、核酸不同，没有模板，是在糖基转移酶的作用下进行合成的。但是合成是如何终止的？为什么有复杂的微观不均一性？哪些因素影响了糖链的合成，又是怎样影响的这些都未知。

糖类研究和核酸研究的结合将为分子生物学谱写新篇章。

糖类的研究也有巨大的应用前景，如植物细胞壁和甲壳质的开发利用等。特别是糖类在分子和细胞识别中的重要性，使得糖类在研究生物"导向"中成为最引人注目的一族大分子。

第二节　多糖的结构及构象分析

多糖结构的"元件"(或单体)是单糖及其简单的衍生物，通常由10种单糖或其衍生物中的一种或几种组成：

单糖{*D* 系列(7种)：葡萄糖，甘露糖，半乳糖，果糖，木糖，葡萄糖醛酸，半乳糖醛酸
L 系列(3种)：岩藻糖，鼠李糖，阿拉伯糖

注意：*D* 与 *L* 是指构型，它们是以丙糖(甘油醛)为参照物界定的，与旋光性的正负有别。

由于单糖分子中各个碳原子具有不同性质的羟基，糖环存在竖立键和平伏键的不同空间配置，连接各个糖单位的糖苷键又有α、β之不同键型，因此任何一种单糖均可能组成11种不同的二聚体和176种三聚体。如果某种多糖含3种单糖单位，三聚体的异构数可达1 056种之多。含100个单糖残基的多糖分子是不大的，但其理论上的异构体数目则是天文数字。不仅如此，很多糖单位的羟基部分地被氨基、乙酰基、甲基或硫酸根取代，各个单糖的糖环构象还可能扭曲或转变，所以天然的多糖分子具有高度种质特异性是可以理解的。

一、多糖结构的层次

应该提到，蛋白质中的肽键和多糖中的糖苷键在结构和性质上很有相似之处：(1)肽键平面上C—N键带有双键性质，显示刚硬的平面结构。糖苷键连接的糖环平面上环氧与C_1间的连接也具有双键性质。(2)多糖大分子的结构，虽然不像蛋白质分子那样有清楚的分类标准，但同样可以分为初级、二级、三级、四级等结构层次，其基本含义与对应的蛋白质结构相同，有关蛋白质大分子链型构造的原理和研究方法，同样是阐述多糖分子构象形态的基础。

1. 初级结构

多糖的初级结构指线性链中糖苷键连接单糖残基的顺序，不涉及任何次级的相互作用。具体地说，多糖的一级结构包括：(1)糖链中糖基的排列顺序；(2)糖基的构型(*D*、*L*)及糖苷键的键型(α、β)；(3)相邻各糖基是通过哪位碳原子上的羟基缩合而成糖苷键的；(4)有无分支结构，分支又是通过哪位碳原子连接的。一级结构不同，它们的空间结构、性质和功能不

同。一级结构决定高级结构。

最简单的多糖是由相同的单糖残基以相同的键型连接成的线性链，其初级结构可以用下列典型的例子来说明。

表 2-1　两种最简单的多糖

多　糖	单体均是 *D*-葡萄糖	重复单位
直链淀粉	1,4 键合的 *D*-吡喃葡萄聚糖　α 型	麦芽糖(α-1,4)
纤维素	1,4 键合的 *D*-吡喃葡萄聚糖　β 型	纤维二糖(β-1,4)

2. 二级结构

多糖的二级结构指的是多糖骨架链间以氢键结合所形成的各种聚合体，显然，多糖的二级结构只涉及多糖分子主链的构象而不涉及侧链的空间排布。

常见的二级结构有带状的、螺旋状的和无规卷曲的三种，它们分别和纤维素、直链淀粉及细菌聚糖三者相对应。更多的多糖的构象介于典型的带状和螺旋之间。

伸展的带状：

代表：纤维素、几丁质

皱折的带状：

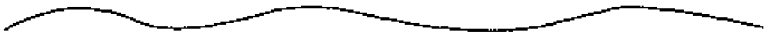
代表：少数多糖在溶液中的过渡态

空心的螺旋：

糖残基几乎与螺旋轴相垂直

代表：直链淀粉（能与I_2显色的原因）

柔顺的卷曲：



代表：一些红菌葡聚糖

图 2-1　多糖的二级结构

在多糖链中，糖环的几何形状基本上是刚性的，各个单糖残基绕糖苷键旋转而相对地定位可以决定多糖的整体构象。然而，单糖残基间旋转角或扭曲角的大小则直接受到两种作用的严格限制：其一是相邻糖环之间的空间阻碍，其二是相邻残基间的非共价相互作用。特别是含竖位基团和邻近横位含较大取代基的糖甙键能最大限度地降低糖残基旋转的自由度，从而限制旋转角的大小。这样的多糖链很僵硬，它们在溶液中往往采取各种卷曲形式。可见多糖的二级结构形式主要依赖于初级结构的排布。

像其他链状高分子一样，多糖分子一般存在各种构象类型：无规卷曲和有序的构象。

(1)无规卷曲的多糖构象：通常在溶液中出现，那里由于构象熵的影响，使一个多糖链具有很多的结合键，因而每个绕键旋转就有相对小的内能变化。多糖链的无规卷曲就代表不断动荡于各种可能形状之间的状态(或称为"平均键合的构象")。

(2)有序的多糖构象：常存在于晶体结构，这里链间和链内的相互作用具有协同动作以保持构象稳定。例如：β-1,4 葡聚糖链中，每一对相邻单元各自的振动都引起多糖形态的伏动，这种多糖的整体构象就是无规卷曲，但在一定条件下，无规卷曲可以向螺旋形转变(有序构象)。

3. 三级和四级结构

多糖链初级结构的重复顺序由于糖单位的—OH、—COOH、—NH_2、—SO_3H 等基团之间有利于非共价相互作用，因而存在有序的二级结构，导致空间有规则而粗大的构象，这就是多糖链的三级结构(也可以这样说，二级结构之间的作用，产生三级结构)。

具有二级结构的多糖链段(包括糖苷键和侧链)在一定程度上可以看成是一个小单位，它们的表面性质(电荷性质，疏水性质，空间位阻等)也常是不均一或不对称的，因此它们还能与多糖分链的其他链段进一步相互作用，进一步构成较紧密的结构形式(三级结构)，也即由于螺旋与螺旋、螺旋与带状、带状与带状之间的作用而形成三级结构。

但也应当看到，在多糖初级和二级结构中，不规则的以及较大的分支结构都会阻碍三级结构形成，另外，外部环境的影响如溶液温度、离子强度改变，也会影响三级结构的形式。

生物多聚体的四级结构常称为亚单位现象。多糖链在形成固有三级结构之后，分子表面仍有一些可以和其他多糖分子链相互作用的基团，装配成一个功能更为完善的体系，这样的组合和结构方式是多糖的四级结构。四级结构并不是每一种生物大分子均有的(在蛋白质化学和多糖化学中，四级结构都是指多聚合物链间非共价键结合形成的聚集体)。多糖链的聚集作用能在同一个分子之间进行(如纤维素链间的氢键相互作用)，也可以在不同的多糖链间进行，由此可见多糖初级结构间非共价作用形成的连接区已经包含聚集体在内。

如上所述，多糖结构形态乃是大分子中各个相邻单糖残基空间相对定位的综合，多糖链中相邻单糖残基之间糖苷结合的二糖单位，实际上是多糖的重复单位(链节)，因此，要推测多糖二级以上的高级结构，可以从研究多糖链中二糖重复单位的构象入手。由于组成多糖的各种单糖各有已知的一定构象形态，因而多糖链中二糖单位的构象可以由相邻单糖残基和桥氧之间旋转角(φ和ψ)的大小来描述。

二、多糖的构象

构象是有机分子因碳碳之间的单键旋转而引起的分子内各种基团或原子间的相对位置的改变，因此构象不同于由手性中心所衍生出的另一种立体异构的概念——构型。理论上说一个多糖可以有无数种不同的空间构象，如果没有某种因素的存在，绝大多数的构象都是处于不断运动的状态，也即多数构象是不稳定的，当然，也有一些因素对一些构象起到稳定的作用。

多糖构象是在一定条件下多糖分子结构的形态。此形态主要是由组成多糖链的单糖构象和连接的糖苷键型以及各个糖单位的空间排列决定的，同时，支链和邻近多糖分子相互之间的挤压常常使多糖形态发生强制性的扭曲。此外，多糖在溶液中的构象由于糖环本身也会扭转和弯曲，在任何瞬间的多糖链形态不可能一样，只能以保持构象平衡时的"平均"构象形态为代表。

第三节　几种常见的多糖

一、淀粉

1. 淀粉的组成单位

麦芽糖。淀粉根据其分支情况分为直链淀粉和支链淀粉，二者比较见表2-2。

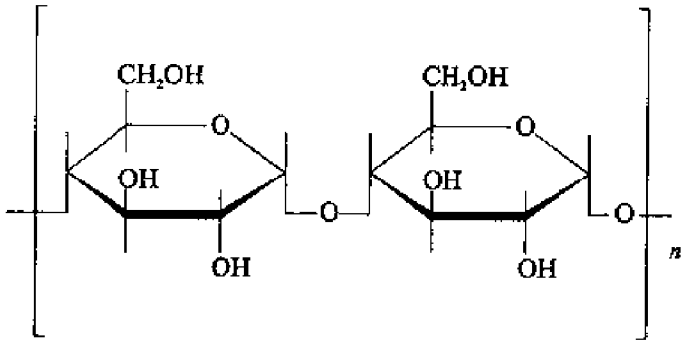


图2-2　直链淀粉的化学结构

表2-2　两种淀粉的性质比较

	直链淀粉	支链淀粉*
在天然淀粉中的含量(%)	20～30	70～80
链　长	250～400个*D*-葡萄糖残基	1 500～6 000个*D*-葡萄糖残基
糖苷键	α-1,4-糖苷键	分支为α-1,6-糖苷键，主链及侧链内部为α-1,4-糖苷键
分子量	5万～10万	10万～100万
70～80 ℃热水中	可　溶	不　溶
极性溶剂(如正丁醇)	形成复合物而沉淀	不起作用(分层)
与$KI-I_2$的呈色反应及其他性质	含36个*D*-葡萄糖残基(或螺旋6圈)以上的淀粉呈蓝色，较短的糖链呈红色、棕色或黄色等不同颜色，吸收$KI-I_2$量为19%～20%淀粉量，即： 淀粉→红色糊精→无色糊精→麦芽糖→葡萄糖 (蓝色)　(红色)　(无色)(无色)　(无色) 能与磷酸、脂肪酸形成复合物	与$KI-I_2$不起作用 可借助于甲基化测定支链淀粉的平均链长。分析支链淀粉甲基化以后水解产物： 左端残基(非还原性葡萄糖残基端)→2,3,4,6-四甲基葡萄糖 链中残基→2,3,6-三甲基葡萄糖 分支点残基→2,3-二甲基葡萄糖 由残基总数与左端残基数之比可计算支链淀粉的平均链长

* 由于测定末端的定量分析较为困难，而且水解中长链也可能水解而断裂，因此甲基化水解的方法不甚可靠，现已改用β-淀粉酶、脱支酶、葡萄糖氧化酶等酶测定法来测定支链淀粉的分支结构。支链淀粉的分子量则以粘度测定法和超离心法较为简便、可靠。

生物化学的发展依赖于实验手段的突破。生化不断采用物理学、化学的新方法和新技术，如电镜、X 射线、电子计算机，才使得人们不断加深对核酸、蛋白质、酶、激素及其他细胞成分的认识。正是人们对分离提纯方法(如电泳、凝胶层析过滤等)的突破和发展，才使人们可以得到单一的组分，从而有可能进一步研究其结构和功能的关系。分离方法的突破促进了生化研究的发展，而新的研究成果又进一步促使更新更好的分离方法问世。

2. 淀粉改性举例

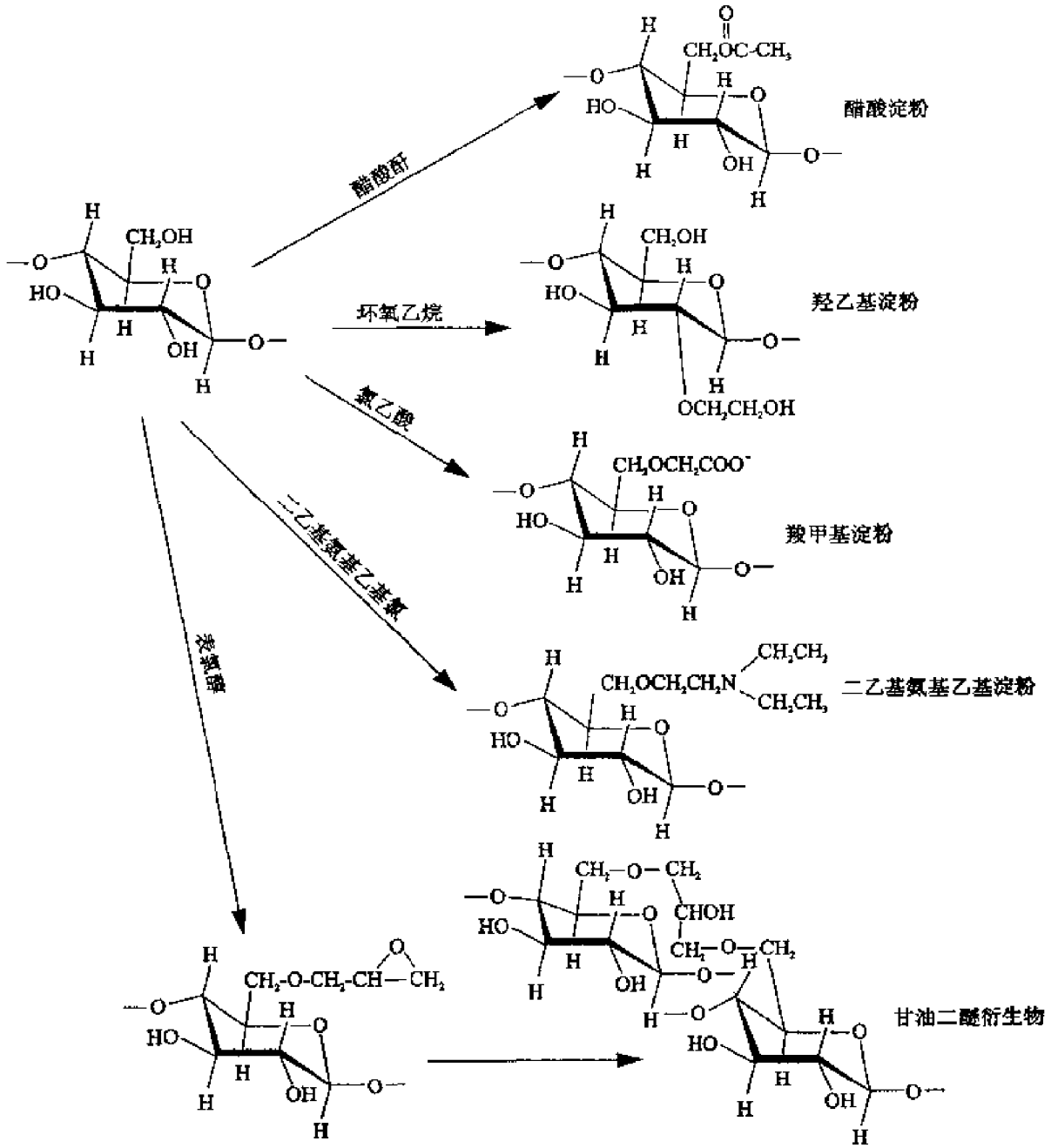


图 2-3　淀粉的部分接支反应

二、葡聚糖凝胶和琼脂糖凝胶

1. 葡聚糖凝胶

葡聚糖凝胶是人工产品，最常用的商品名为Sephadex，是由右旋葡萄糖苷链与环氧氯丙烷结合形成甘油醚键，把许多右旋糖苷链互相交联而形成的网状大分子。Sephadex是目前每个生化实验室都必备的试剂之一，主要用于生物大分子的分离。

我们知道在生化研究和分子生物学研究中，常常需要精细地从复杂的生物组织中分离纯化某种物质，并尽可能维持物质原来的性状(保持天然状态)，尤其是一些生物活性物质，如酶，还得考虑其失活的可能性。高分子物质的表征，首先是取得样品，但如何取得样品却很不相同。生物大分子的研究首先是提取，因此有一整套完整的提取方法、试剂、仪器等，而合成高分子则是人工合成，因而也有完整系统的合成理论及方法、工艺条件及设备。生化工作者一直期待着更先进的分离分析方法，相继发展的离子交换层析(按物质的酸碱度、极性和分子大小的差异而加以分离)、电泳分离(根据物质所带电荷在电场中移动性质的不同而得以分离)和制备超离心(按物质的扩散系统、质量和浮力因子的不同而加以分离)等在推动生化和分子生物学发展上都曾起了一定作用。然而，这些方法或因设备昂贵、操作复杂，或因分离容量小，或因不够精确等都有一定的缺陷。20世纪60年代初，瑞典的Flodin首先试制成交联葡聚糖(商品名Sephadex)，并用于生物化学研究中一些物质的分离，取得了甚为满意的结果。这种分离方法主要根据物质的分子量不同，通过固定相(凝胶)具有分子筛的性质，采用一般柱层析方法就能使物质达到分离纯化的目的。它具有比制备超离心简便易行而比透析法更正确可靠的特点。由于这种方法设备简单、易行、操作方便，因此各国科学工作者均普遍采用了这一技术，在短短数年时间内就发展成为生化研究中一种惯用的分离分析方法。随着交联葡聚糖凝胶的使用，又相继发展了聚丙烯酰胺凝胶(商品名为Bio-Gel)和琼脂糖凝胶(商品名为Sepharose)等等。目前凝胶层析这一技术不但广泛地应用于科学实验研究，而且已较大规模地用于工业生产。

合成Sephadex所用多糖的原料是由右旋葡萄糖残基组成的多糖，其分子间以α-1,6-糖苷键相连(占95%)，与淀粉中的α-1,4-糖苷键、纤维素中的β-1,4-糖苷键有别。Sephadex结构中链之间是C_4-OH通过环氧氯丙烷与另一链上的C_4-OH连接的，分支点为1,3-糖苷键(占5%)。这种葡聚糖通常用微生物厌氧培养法生产，菌种为肠膜状明串珠菌NRRLB-512(Leuconostoc mesenteroides)，以蔗糖为培养基，在23 ℃静止培养22～24 h即能发酵生成高分子量(分子量分布为10×10^5～300×10^6)的多聚糖的粘稠物质。由于发酵生成的葡聚糖分子量极高，需要降解成一定分子量的物质才能使用。一般采用部分酸水解的方法解聚，大致的方法是：100～120 ℃时用稀盐酸水解60 min，即可水解成不同分子量的产物。在制备凝胶中所用的葡聚糖的平均分子量一般为4×10^4～20×10^4。制备交联度高的凝胶用平均分子量较小的葡聚糖(Sephadex G-25，一般用4万至5万)，制备交联度低的凝胶用平均分子量较大的葡聚糖(Sephadex G-200，一般用20万左右)。

Sephadex是由一定平均分子量的葡聚糖和甘油基以醚桥（$-O-CH_2CH(OH)-CH_2-O-$）形式相互交联形成三维空间的网状结构，而成为不溶于水的物质。其交联度的大小可通过控

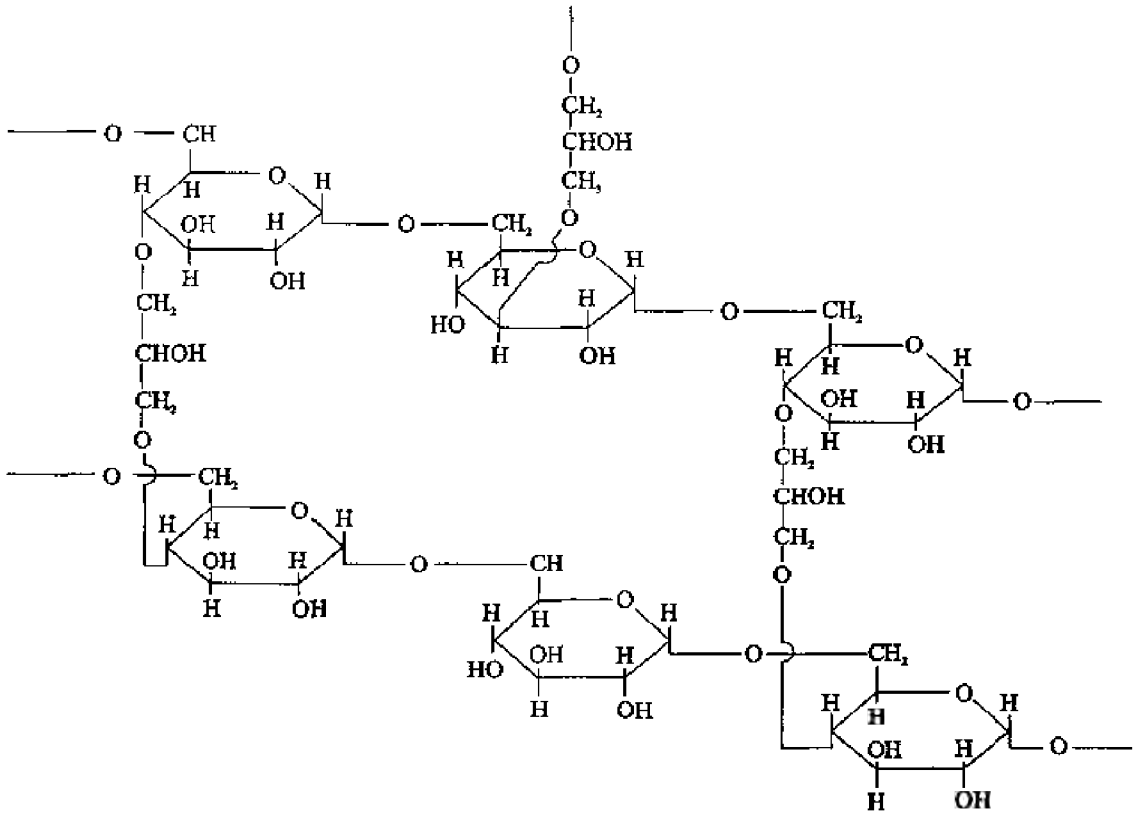


图 2-4　交联葡聚糖的化学结构

制交联剂(一般为环氧氯丙烷)和葡聚糖的配比及反应条件来掌握。目前市售的Sephadex 都是珠状型的。它是将葡聚糖和交联剂在搅拌下于一定粘度的分散剂(油)内分散成型。各种型号的交联葡聚糖在制备方法上基本相同。只要控制搅拌速度和分散剂的粘度就能得到一定颗粒度的交联葡聚糖。商品凝胶的各种型号即代表"网眼"的不同大小,也就是被分离物质允许自由出入"网格"的分子量的范围。

表 2-3　交联葡聚糖的技术数据

凝胶类型 (Sephadex)	颗粒直径 (μm)	工作范围(M.W.)		得水值 (mL/g 干胶)	床体积 (mL/g 干胶)	溶涨平衡的最少时间(h)	
		肽或球状蛋白质	葡聚糖(线性分子)			室　温	沸水浴
G-10	40～120	<700	<700	1.0±0.1	2～3	3	1
G-15	40～120	<1 500	<1 500	1.5±0.2	2.5～3.5	3	1
G-25(大颗粒)	100～300	1 000～5 000	100～5 000	2.5±0.2	4～6	6	2
G-25(中等大小)	50～150						
G-25(细)	20～80						
G-25(超细)	10～40						
G-50(大颗粒)	100～300	1 500～3 000	500～10 000	5.0±0.3	9～11	6	2
G-50(中等大小)	50～150						
G-50(细)	20～80						
G-50(超细)	10～40						

续表

凝胶类型(Sephadex)	颗粒直径(μm)	工作范围(M.W.)		得水值(mL/g 干胶)	床体积(mL/g 干胶)	溶涨平衡的最少时间(h)	
		肽或球状蛋白质	葡聚糖(线性分子)			室温	沸水浴
G-75	40～120	3 000～70 000	1 000～50 000	7.5±0.5	12～15	24	3
G-75(超细)	10～40						
G-100	40～120	4 000～150 000	1 000～100 000	10.0±1.0	15～20	48	5
G-100(超细)	10～40						
G-150	40～120	5 000～400 000	1 000～150 000	15.0±1.5	20～30	72	5
G-150(超细)	10～40						
G-200	40～120	5 000～800 000	1 000～200 000	20.0±2.0	30～40	72	5
G-200(超细)	10～40						

注：颗粒直径指干胶粒，湿粒直径可从$(1+W_r \cdot d)^{1/3}$计算；W_r为得水值；d为干胶的密度，对于交联葡聚糖凝胶来说其约为1.64 g/mL。

从上表可见：

(1)得水值大的凝胶(G-75到G-200)可分离1万以上分子量的蛋白质。

(2)得水值低的凝胶(G-10到G-50)只用于肽的分离或组别分离(脱盐法)，一般脱盐用G-25比较适当。

注意几点：

(1)层析(分子筛)与通常用网筛有别："大先出，小后出"。

(2)工作范围(或叫排阻限度)：大于工作范围的分子不能进入胶内，直流而下。

(3)床体积(溶胀度)：每克干重凝胶颗粒在水中充分溶胀时所具有的凝胶总体积(mL/g 干胶)。

(4)得水值(吸水量)：1 g 干重凝胶颗粒充分溶胀时所需水的毫升数(不包括颗粒间隙的液体)(mL/g 干胶)。

(5)不同型号的交联葡聚糖用英文字母G表示，如G-25、G-200，在G后面的阿拉伯数字为凝胶的得水值再乘以10。

2. 琼脂糖凝胶

自从Sephadex层析作为生化的一种分离方法以来，有人再次做了琼脂作为层析凝胶载体的研究。根据琼脂的性质，它的工作范围远大于Sephadex，它的工作范围下限几乎相当于Sephadex工作范围的上限，因此，琼脂糖凝胶的应用扩大了层析凝胶使用的范围，从而有可能分离一些分子量极高的物质(如病毒)。

琼脂糖凝胶完全是天然的，它来源于一种海藻，主要是由*D*-乳糖和3,6-无水-*L*-乳糖为残基组成的线性多聚糖。Sephadex属半合成的，还有一种聚丙烯酰胺(商品名：生物凝胶—P；Bio-Gel P)则完全是人工合成的。

(1)琼脂在热水中易溶解，低温时则凝固成胶体，即使低至0.5%的浓度也能形成胶体；

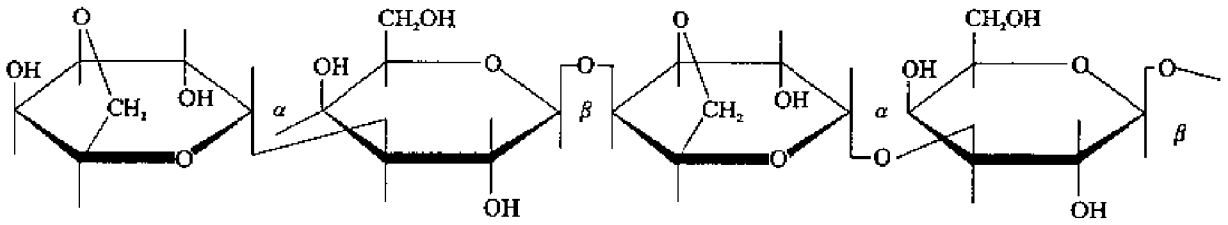


图 2-5　琼脂糖凝胶的化学结构

(2)由于琼脂固化时性质上不发生任何改变，因此常利用琼脂的这一特性作为固化液体的介质，如微生物培养中常用的斜面培养基；

(3)琼脂凝胶有比较大的“孔隙”，允许较大分子渗入，因此在其他分离技术中亦用于作为载体，例如“凝胶电泳”。

从海藻提取的琼脂常为琼脂糖(食品工业中常用来制造果冻、果酱等)和琼脂胶(agaropectin)混合物。琼脂胶主要是一种磺化的酸性粘多糖，因此琼脂糖的制备主要是从各种混合物中除去琼脂胶。常用的方法：用季胺化合物(碱性)，如十六烷基吡啶盐，将琼脂胶沉淀除去，过量的沉淀剂(十六烷基吡啶盐)则用白土吸附，这样就可得到层析所需的琼脂糖。还可用环氧氯丙烷先交联，使之成为沸水中不溶胶。

琼脂糖凝胶的商品名因生产厂家不同而异，目前有：

Sepharose(瑞典)最常见，还有 Bio-GelA(美国)、Sagavac(英国)、Gelarose(丹麦)等，除了 Sagavac 以外，都已制成了珠状凝胶。

表 2-4　有关琼脂糖凝胶的性质

凝胶类型		颗粒直径(μm)	工作范围(分子量)(dolton)	琼脂糖浓度
Sagavac	2	66～142(F) 142～250(C)	5×10^5～15×10^7	2
	4		2×10^5～15×10^6	4
	6		5×10^4～2×10^6	6
	8		2.5×10^4～7×10^5	8
	10		1×10^4～2.5×10^5	10
Sepharose	6B	40～120	1×10^4～4×10^6	6
	4B	40～190	1×10^4～2×10^7	4
	2B	60～250	1×10^4～2×10^7	2
Bio-Gel	0.5m	50～100 100～200 200～400	$<10^4$～0.5×10^5	10
	1.5m		$<10^4$～1.5×10^6	8
	5m		1×10^4～5×10^6	6
	15m		4×10^4～15×10^6	4
	50m		1×10^5～50×10^6	2
	750m		1×10^6～150×10^6	1

注：①Sepharose 有 3 个型号(2B、4B 和 6B)，阿拉伯数字即为凝胶中干胶的百分含量。

②Bio-Gel A 有6个类型，即1%，2%，4%，6%，8%和10%，百分数代表干胶量。

③Sagavac 又分成SEG A2F，……10F 和2C……10C。前面的阿拉伯数字为凝胶中干胶的百分含量，而F 代表细粉末状(直径为66～142 μm)，C 为颗粒状(直径为142～250 μm)。一般用聚乙烯乙二醇分部法制备。

注意几点：

(1)凝胶浓度越低，其结构也越松散，即多孔性越高，可分离的蛋白质分子量越大，其机械强度则随浓度的降低而减少。

(2)琼脂糖凝胶极易用CNBr 活化并引入不同基团，亲和层析最适用的是4B。

(3)琼脂糖凝胶能分离较高分子量的物质，弥补了交联葡聚糖胶的不足，这是它的最大优点。它的最大弱点是带有大量电荷，主要仍然是磺酸基和一定量的羧基，因此层析分离时常常需要使用较高离子强度的洗脱液才能降低或消除离子交换效应，这样就使得洗脱液中不可避免地包含一定量的盐，经层析后还得经过透析或Sephadex 柱层析才能除去这些盐。这在一定程度上影响了它的发展。

(4)琼脂是一种大分子结构的多聚糖，维系空间结构的是氢键而不是共价键，氢键断裂剂(尿素)能破坏琼脂的结构。但琼脂的氢键又与一般高分子的氢键结构不同，中等浓度的尿素不能改变琼脂的机械性质。从琼脂的空间结构和能使高分子渗入的较大"孔隙"推测，它可能是一种微晶。琼脂凝胶(完全是天然状态)的另一缺点是对热不稳定(50 ℃即熔化)和受pH 的影响(只在pH 4.5～9.0 之间稳定)，不过在分离生物高分子物质时，一般都在它的允许范围之内，所以操作上不会造成多大困难。

(5)琼脂糖一经干燥，可能改变其层析性质，因此一般均湿态保存。只要适当防止微生物污染，琼脂糖可贮存较长时间而不改变其层析性质。近年来的研究表明，琼脂糖除了由氢键维系其结构外，还有疏水作用，因此只要逐步脱水，仍可维持其原来的性质。用丙酮逐步脱水，或将琼脂糖用少量环氧氯丙烷交联后再脱水，均能得到重新溶胀的琼脂糖。这种重新溶胀的琼脂糖，不但颗粒形状未改变，分配系数 K_d 值也不受影响(K_d 是凝胶层析的一个特征常数，即溶质在流动相和固定相之间的分配比例)。

(6)由于琼脂糖胶属大网孔型，所以虽有一定的机构强度，但颗粒比较软，在层析时会出现压紧和阻塞层析柱造成流动困难的现象。琼脂糖含量在4%以上的凝胶，阻塞现象较为轻微。

在选用层析胶时"工作范围"的数据十分重要，选用得当才有理想的结果。

三、几丁质/壳聚糖

1. 概况

甲壳质是甲壳素(又叫几丁质，chitin)和壳聚糖(又叫甲壳胺，几丁聚糖，chitosan)的总称，主要是从虾、蟹废弃物的外壳中提取的自然界中惟一的生物含氮多糖分子，在自然界生物合成量约为每年百亿吨，是地球上仅次于纤维素的第二大可再生有机资源。它广泛应用于医药、食品、轻工、化妆品、纺织印染、生化材料、膜材料、农业及环保等领域。国际社会非常重视对此类再生资源的研究开发，自1977 年以来，分别在美国、日本、意大利、挪威、英国、波兰、法国召开了7 次甲壳质专题的国际学术会议，2000 年9 月在日本山口县又召开了第八届甲壳素/壳聚糖的国际学术会议和第四届亚太地区甲壳素会议。

另外，日本在1989年6月就成立了几丁质、几丁聚糖研究会，欧洲则在1992年成立了几丁质研究会，他们每年均召开一次年会。

我国海域辽阔，江河湖泊纵横交错，捕捞、养殖、加工业非常兴旺，甲壳质资源非常丰富，因此，在我国广泛深入开展甲壳质化学及应用研究意义重大，既开发资源，又治理环境，变废为宝。近几年，国内在大连、北京、武汉及浙江玉环县等地也相继召开过甲壳素专题研讨会。我们还非常高兴地看到，继1958年包光迪先生的《甲壳质的利用》一书问世以后，蒋挺大教授编著的《甲壳素》一书又于1996年与读者见面了，中国甲壳质研究会（作为中国化学会应用化学委员会的下属学会）也于1999年11月在武汉大学成立，以后将定期召开学术会议。在产业方面，我国甲壳质的年产量是世界第一位。经历了几十年的历程，我国已经产生了一大批（上百家）甲壳质生产企业，其中一些已经初具规模和实力。有的企业年产量高达数百吨，生产的品种也从单一向多品种转化。产品部分内销，大多出口创汇，经济效益显著。现从事甲壳质研究的专家和学者至少有百人以上，建立了一支有一定水平和实力的科研队伍，并在甲壳质应用的十多个领域取得了显著成果，特别是已有十几个企业取得甲壳质生产食品类保健品的准号，还有3个企业获得农药批号，显示了极大的发展潜力，可以说我国的甲壳质事业正方兴未艾。

2. 甲壳质的化学

甲壳质是甲壳素和壳聚糖的统称。甲壳素（chitin，CA登录号：1398-61-4）是一种乙酰氨基多糖，它的结构与纤维素十分相似，可以看成是纤维素的单糖残基中2位上的羟基（—OH）被乙酰氨基（—$NHCOCH_3$）所取代的结果，即2-乙酰氨基-β-1，4-葡聚糖。壳聚糖（chitosan，CA登录号为9012-76-4，国外商品名为Florae N）是甲壳素脱乙酰基的产物，即2-氨基-β-1，4-葡聚糖。

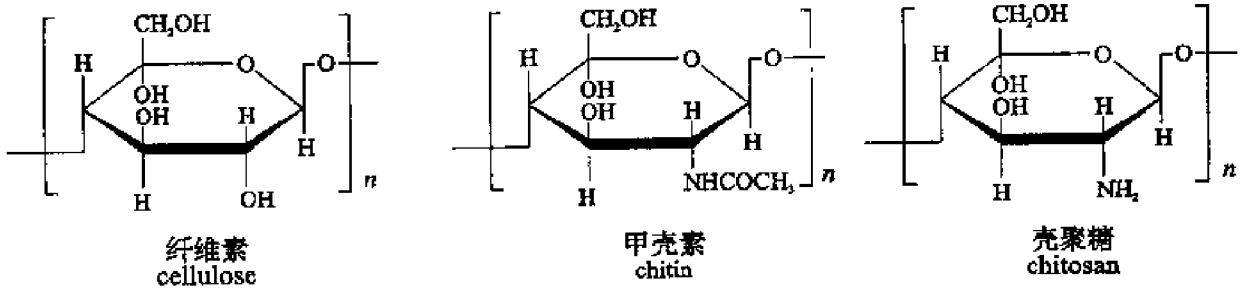


图2-6 甲壳质的化学结构

甲壳素化学也有其内在的规律和完整的框架体系，如图2-7所示：

图中7种物质不但相互关联，而且可以相互转化，从而构成了甲壳素化学的基本框架，在此我们把这些物质称之为关键物质。另外，6个角的6种物质经过一定的化学修饰又可以生成各种各样的衍生物，以满足人们的各种需要。甲壳素化学就是研究这些关键物质及其衍生物的制备、结构、理化性质、反应规律及应用的科学。

甲壳素在生物学上称为几丁质，是真菌细胞壁的常见组成成分，与真菌细胞形态的发生和维持以及分隔的形成有关，对真菌的生长和功能具有特殊的意义。硅藻中甲壳素的含量也

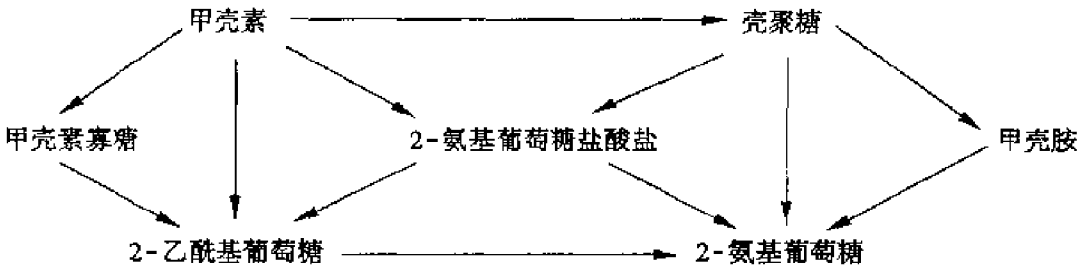


图2-7 甲壳素的框架体系

很高。而甲壳质更大量存在于昆虫(如蛆皮、蛹壳)和甲壳类动物的甲壳中,它与脂蛋白交织成十分坚韧的网络结构。可用于提取甲壳质的材料有:蟹壳、虾壳、虾蛄壳、蛆皮、蛹壳及海螵蛸等。其中几种原料的成分见表2-5(质量百分比):

表2-5 生产甲壳质的几种原料的成分

成分 \ 原料	虾 壳	蟹 壳	蛆 皮	海螵蛸
无机盐	45	50	4	0.5
脂蛋白	30	28	58	59
色 素	少 量	少 量	极微量	极微量
甲壳素	22	18	35	40

目前最经济也最广泛采用的方法还是从虾、蟹的外甲壳中提取甲壳质。近几年来用蝇蛆制备甲壳质的报道多了起来。有消息报道蝇蛆制备的壳聚糖其价格高达27美元/g,大约是普通虾、蟹壳制备的壳聚糖的1 000倍。价格如此悬殊,则前者必然有其特殊用途和特殊性能,技术含量也一定很高,因此,有关国家对其技术文件的处理仍处于秘而不宣的阶段。前几年我们也做过蛆皮提取甲壳胺的工作。另台湾新达生物科技股份有限公司则致力于另一类甲壳素——β型甲壳素的研究开发。β型甲壳素不同于从虾、蟹壳中提取到的α型甲壳素,它主要存在于海螵蛸中。据报道用它制造隐形眼镜有许多独特的优点。

组成上的差别导致甲壳素生产工艺的明显不同。以虾、蟹壳为例,甲壳质的生产工艺流程示意图如下:

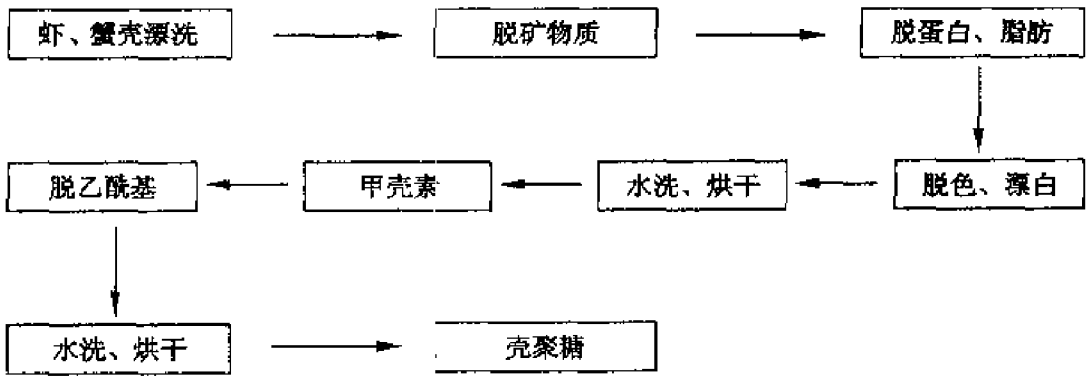


图2-8 甲壳质的生产工艺流程示意图

甲壳素不溶于酸、碱、水，故又称之为不溶性甲壳质、甲壳素或几丁质，而脱乙酰基后的甲壳质可溶于稀酸(如醋酸)溶液，又称为壳聚糖、几丁聚糖、甲壳胺或可溶性甲壳质(素)等。我们通常说的甲壳质在大多数情况下就是指壳聚糖，在应用中也大都是壳聚糖。目前，国内外甲壳素和壳聚糖产品的主要质量指标见表2-6。

表2-6 甲壳素/壳聚糖产品的主要质量指标

指标 / 产品	颜色	形状	水分(%)	灰分(%)	重金属(μg/g)	粘度(cp)			脱乙酰度(%)
						低	中	高	
甲壳素	白色或淡黄色	片状或粒状	≤10	≤1.0	≤2.0	—	—	—	—
壳聚糖	白色或淡黄色	粉末或片状	≤10	≤0.5	≤1.5	≤200	200～1 000	≥1 000	75～95

根据结构上的相似性可以找到甲壳质类同于纤维素的用途，还可以从氨基多糖——这一自然界中惟一的带阳离子的能生物降解的碱性氨基多糖的高分子聚合物的特点出发，找到更多很有魅力的新用途。以下综合有关文献及结合自己的工作体会就甲壳素作为环境友好材料的应用方面作一简述。

3. 甲壳质作为环境友好材料的应用

甲壳质由于其分子结构中含有羟基、乙酰氨基、氨基等而可进行多功能基化学反应，从而得到一系列具有不同优异性能的衍生物，表现出其多功能反应性、立体结构与手性特征。尤其是其具有的动植物组织和器官生理适应性、安全性，可完全分解性及亲水性和再生性，使其在生物医学和环境友好功能材料的应用方面受到众人青睐。

(1)医药(见本章第五节)。

(2)食品：甲壳二、三聚糖具有非常爽口的甜味，可作为糖尿病和肥胖病人的可食甜味剂。甲壳低聚糖具有调降血压、消除脂肪肝、增强免疫力的功能，它还能提高食品的保水性及进行水份活性的调节等，近几年作为保健品的甲壳质类产品已创造了惊人的经济价值。另外，融壳聚糖功能与微量元素(锌、铁、镁、钙等)为一体的生物多糖微量元素络合物的合成与开发，为临床微量元素的应用研究提供了一类新的有效功能食品添加剂以及应用于多种疾病的药物辅助治疗剂。我们实验室3年前已研制出了活力多糖锌的食品添加剂。另外，甲壳质可做糕点、面条以及各种饲料的添加剂、调味品、固体酱油等，在水果、鲜花、蔬菜及肉、鱼制品上，壳聚糖及其衍生物是很好的保鲜剂，现已得到广泛应用。

(3)日用化工：壳聚糖具有的成膜性、保湿性及抑菌功能，使得壳聚糖用其接枝改性改变了溶解性能后的一系列甲壳质衍生物已在日用化工领域得到了广泛应用，该行业目前是壳聚糖的最大用户。用甲壳质为原料制造的摩丝是一种既能固定发型，又有护理头发、柔软头发作用的美容化妆品。用壳聚糖配制的洗发香波以及头发调理剂、护肤剂、固发剂等，均是多功能的上档次品种，面且这类产品的洗涤废水均是可分解的无二次污染的环保型日用化工品。

(4)功能膜材料：用壳聚糖制成的膜在分离水—酒精混合物方面已得到成功应用。壳聚

糖是一种网状结构，机械性能良好，化学性质稳定，耐热性好，且价廉易得。用甲壳质作为酶和细胞的固定化载体已在工业上使用多年。另外，壳聚糖的易生物降解性使其在研制降解性塑料方面也受到重视。用壳聚糖与有机酸共混制成可食包装薄膜，能用标准的包装设备和热封设备进行包装，具有质地优、透明度高和抗菌性良好的特点，可用于切片水果或去皮水果的保鲜包装，另外它还可以用来包装快餐面、快餐袋、调味品等，并可直接放入锅中烧煮而不需要将包装纸除去。

(5)农业：壳聚糖在农业上的应用正成为一个研究热点，并已展示出良好的前景。它可配成土壤改良剂、植物生长调节剂、种子包衣、幼苗叶片喷洒剂(诱导抗性和壮苗)，也可用于杀虫剂、杀菌剂，还可用于饲料添加剂和饵料粘合剂等。前两年我们与福建农业大学合作开展了甲壳胺作为水稻种子包衣的研究工作，经2年的重复实验，证明甲壳胺对水稻根的生长有明显的促进作用。

(6)轻工业：甲壳质在轻纺工业中作为纤维织物的上浆剂、固色剂。在造纸方面，可作为纸面施胶剂。

(7)环保：壳聚糖由于分子中含有氨基，具有较强的螯合金属离子的能力。可以利用壳聚糖的这一性质富集一些十分有价值而含量很低的金属元素，或者利用这一性质去捕获一些有害的重金属离子，如铅、镉、汞等及一些放射性元素。壳聚糖作为絮凝剂在处理食品加工厂的废水、回收蛋白质作为饲料方面已被大量采用。另外，壳聚糖作为生化载体在污水处理方面的应用(如：活性污泥的颗粒化、厌氧菌体的固定化等)也已展示出良好前景。

值得一提的是，甲壳素作为饮用水的净化剂，在日本、美国已普遍使用。据统计，日本每年用于水处理的壳聚糖约有500吨。美国环保局也批准壳聚糖用于饮用水的净化，据美国新泽西州某高技术公司预测，到上世纪末，用于水处理的壳聚糖约值1 400万美元。目前自来水的消毒主要是用氯气，而混凝沉淀处理主要是用聚铝、聚铁和聚丙烯酰胺等混凝剂，其中聚铝用量最大。近十年研究已表明，水体中的残余铝进入人体后通过蓄积会产生老年性痴呆症，而残留的铁会给自来水带来颜色并有腐蚀性，聚丙烯酰胺则由于存在单体丙烯酰胺而不可避免地带有毒性，其应用也严格受到限制，氯气消毒效果不错，但也会在自来水中产生和残留有机氯化物，而它们是潜在的致癌物质。2000年起我国实行了新的生活饮用水标准，一级水指标共92项，二级水指标为52项。如将其二级指标与以前执行的GB5749-85标准比较，前者的项目多了17项，其中无机盐2项、卤代烃类7项、农药类7项、微生物类1项。前者还特别对铝、钠、有机氯代烃及农药类残留量作了限制。这对传统的自来水处理系统提出了严峻的挑战，同时也提示我们甲壳质极有可能另辟生活饮用水的应用领域。

四、纤维素

纤维素的化学结构为$\beta(1,4)$-*D*-葡聚糖，结构组成单元为*D*-葡萄糖。

纤维素分子很大：聚合度300～500，分子量为5万～40万。纤维素不溶于水，呈带状结构(不是折叠的)。

常见的天然纤维素有棉花(籽纤维)、亚麻、大麻、苧麻、黄麻(壳/茎纤维)，前三者可做服饰，后二者一般做麻袋及绳等。此外，天然纤维素还有马尼拉麻(叶纤维)、木棉(隔热材料)。

水合纤维：纸、羊皮纸、牛皮纸和硬化纸板。

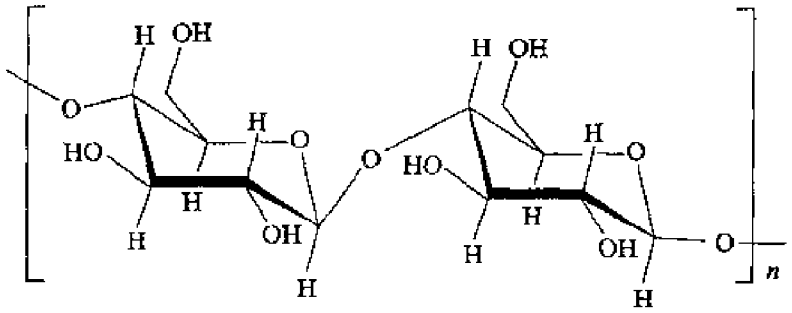


图 2-9　纤维素的化学结构

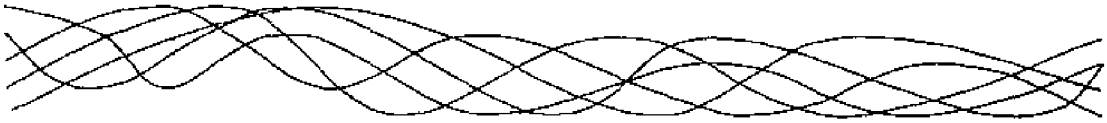


图 2-10　扭在一起的纤维素链

再生纤维

铜氨法：玻璃纸

粘胶法：人造丝、薄膜、玻璃纸

工业上用的纤维素衍生物有：

(1)硝酸纤维素

(2)醋酸纤维

(3)纤维素醚

(4)纤维素羟烷基醚

(5)羟甲基纤维素

五、果胶

果胶多糖，习惯称为果胶糖物质。果胶(pectins)是植物特有的细胞组分，就化学组成和生物合成而言，它可能是最复杂的一类多糖。

现在确认果胶酸具有下列结构，它所含的甲氧基通常不超过0.8%。

果胶酸是聚 α-(1→4)-*D*-半乳糖醛酸，其中糖醛酸的羟基可能不同程度地甲基酯化，并部分或全部形成盐。

果胶存在于各种高等植物中，柠檬和橘子中果胶含量高达30%。在甜菜糖汁中果胶含量也很高。从生化角度分析，果胶是细胞壁的一种粘结剂，很可能控制着离子的渗透，也可能对植物的食物储存的代谢起某些作用。果胶在工业上用做增稠剂和胶凝剂。果胶的提取方法随应用目的的不同而有所不同：作为胶凝剂，可将植物用加酸的水抽提，再用乙醇沉淀得到，而作为增稠剂，则用碱提取。

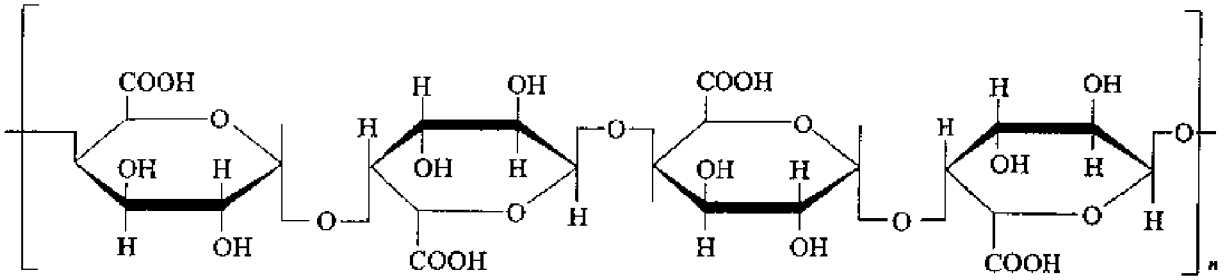


图 2-11　果胶酸的化学结构

果胶类物质最引人注意的特征是形成凝胶和胶冻。果胶水溶液在一定酸度(pH 2～3.5)与糖共沸，冷却后形成果胶-糖-酸固体胶冻，这是制造果酱的基本过程，煮沸是为了浓缩果胶溶液。

六、褐藻胶

1883 年《化学新闻》报道了 Stanford 的文章，他用 Na_2CO_3 稀溶液处理海带，得到的胶状溶液被称为“褐藻胶”(Algin)。在20 世纪30 年代后期，已证实褐藻胶中的*D*-甘露糖醛酸聚糖是 *β-D-*(1-4)键合的，具有如下结构：

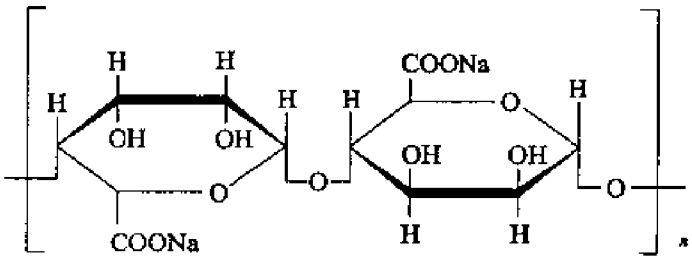


图 2-12　褐藻胶的化学结构

褐藻胶结构单位的式量理论值为198.11，平均真实值为 222.00，这主要是甲基化所致。褐藻胶的分子量为 32 000～250 000。

海带中除了褐藻胶，还含有粗蛋白质、粗纤维、甘露醇、脂肪、海藻淀粉及无机质等多种成分，必须除去这些成分，才能得到纯褐藻胶，所以在褐藻胶生产过程中，主要工序都是为了这一目的而设置的。

褐藻胶是一种亲水性的天然多糖类，也是我国海藻工业的一个主要产品。

褐藻胶是褐藻酸盐、褐藻酸衍生物的统称，是*α-L-*古罗糖醛酸和*β-D-*甘露糖醛酸的共聚物。在一个分子中，可能是只含有其中一种醛酸构成的连续链节，也可能是由各种糖醛酸链节构成嵌段共聚物。各种糖醛酸在分子中的比例变化以及其所在的位置不同，直接导致褐藻胶的性质差异，如粘性、凝胶性、离子选择性等。

褐藻酸的一价盐(Na^+、K^+、NH_4^+)、部分二价盐(Mg^{2+},Hg^{2+})衍生物可溶于水,而褐藻酸本身及除Mg^{2+}、Hg^{2+}以外的二价盐、三价盐(如Al^{3+}、Fe^{3+}、Cr^{3+})均不溶于水。

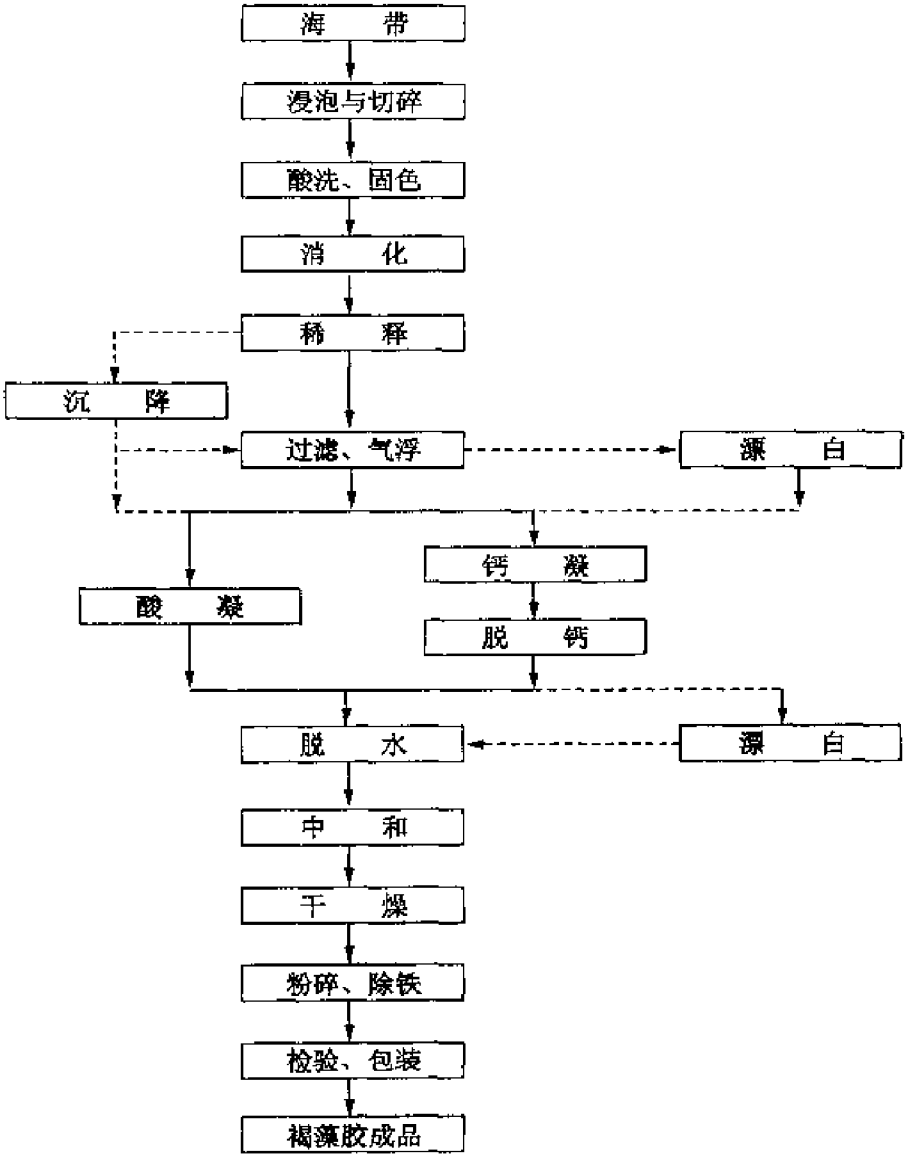


图 2-13　褐藻胶生产工艺流程框图

褐藻酸广泛应用于工农业生产的各个方面,可作为增稠剂、分散剂、乳化剂、稳定剂、粘结剂、成膜剂、凝胶剂和离子交换剂。其应用领域包括:食品工业、纺织工业、医药工业、日化工业、造纸工业、橡胶工业、机械工业、水处理、石油工业、建材工业、陶瓷工业、感光材料、农药、饲料等。

七、透明质酸(hyaluronic acid,HA)

以上介绍的几种多糖(除褐藻酸外)均属于单纯多糖中的同多糖部分,下面介绍两种单纯多糖中的杂多糖。

HA 的结构式为：

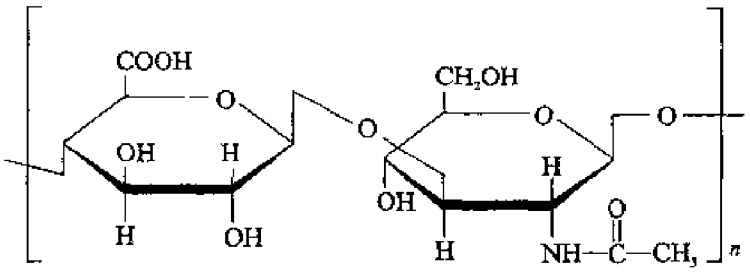


图 2-14　透明质酸的化学结构

透明质酸又叫“脐带多糖”。

HA 与蛋白质结合存在于眼球玻璃体、角膜、脐带及一切结缔组织中，其主要功能是吸收水分形成粘稠凝胶，有润滑、联结和保护细胞的作用。

一些具有强烈侵染性的细菌以及恶性肿瘤、蜂毒与蛇毒中都含有透明质酸酶，它能引起 HA 的水解，使其粘度减低，从而令病原体等得以侵入和传播。

八、肝素

肝素(heparin)也是杂多糖，它是Mclean 于1916 年首先从心脏和肝组织提取到的，由于肝中的含量最为丰富，故而得名。实际上肝素广泛分布于哺乳动物的组织和体液中，如肺、血管壁、肠粘膜等。

肝素的结构单元为：

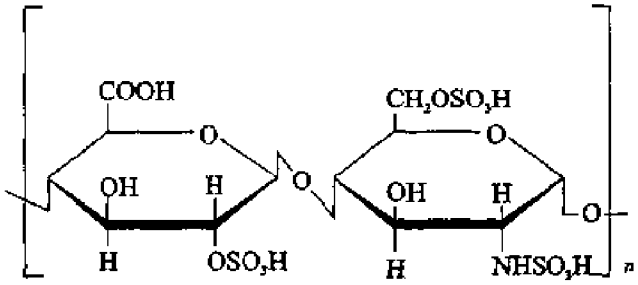


图 2-15　肝素的化学结构

肝素是动物体内天然的抗凝血物质，对于维持血液在血管内流通起着重要作用。其制品已广泛用于临床，作为防止血栓形成及输血用的抗凝剂。

近来研究表明，猪小肠粘膜中肝素含量更为丰富，因此从食品加工厂、香肠加工厂的下脚料中提取肝素是一种有价值的方法。

肝素作为抗凝血剂应用于临床至今已有 50 多年历史，长期应用而不衰。我国出口的肝素风靡欧美许多国家，年创汇 1 000 余万美元，这是值得我们重视的。

美国每年耗用肝素最多，主要用于急性心肌梗塞症的治疗和肾病患者的渗血疗法。

九、糖蛋白

人血型是根据个体血液中血型物质的差异进行分类的。血型物质是一种复合多糖，目前对其了解比较清楚。血型物质有3种：A凝集原，B凝集原，H物质。

红细胞凝集反应：当一个人的红细胞同另一个人的血清相混合时，有时可以看到红细胞粘聚在一起，成为一簇簇不规则的细胞团，这种现象称为红细胞的凝集反应。

同种类动物的不同个体之间所发生的凝集反应称为同种凝集反应，不同种类动物的不同个体之间的凝集反应称为异种凝集反应，红细胞表面所含的抗原性物质称为凝集原，血清中所含的特异性抗体物质称为凝集素。

当含有某种凝集原的红细胞遇到一种与它相对抗的凝集素时，才发生凝集反应。

1900年，发现人类的红细胞中含有两种不同的凝集原：A凝集原和B凝集原。同时也发现人类血清中也含有两种与其相对应的凝集素：抗A、抗B。人类血型就是根据红细胞中所含的A、B原而分类的。

A型：人红细胞中只含A凝集原，血清含抗B。

B型：人红细胞中只含B凝集原，血清含抗A。

O型：红细胞中既不含A原也不含B原，血清含抗A又含抗B。

AB型：红细胞中既含A原又含B原，血清不含抗A也不含抗B。

人的血清中，不含有同他自身红细胞凝集原相对抗的凝集素。

表2-7 ABO血型分型系统

红细胞所含的凝集原	/	A	B	AB
血清中所含的凝集素	抗A，抗B	B	A	/
血　　型	O	A	B	AB

红细胞不仅含有A、B原，而且这4种血型的红细胞还都含有一种H物质，它是生成A、B原的物质基础。O型的红细胞虽不含A、B原，但也含有H物质。H物质是一种糖蛋白，糖链的末端糖基为岩藻糖基(6-脱氧-*L*-半乳糖)。

(1)若在H物质的糖链近末端半乳糖基上接上1分子*N*-乙酰氨基半乳糖即为A原。

(2)若在H物质的糖链近末端半乳糖基上接上1分子半乳糖即为B原。

(3)若在H物质的糖链近末端半乳糖基上有的接*N*-乙酰氨基半乳糖，有的接半乳糖，则其血型为AB型。

由上可见，糖链末端的微小差异表现了不同的生物学性质。

各种细胞诸如高等动物的细胞膜上以及单细胞生物(如细菌及病毒)的外壳中都含有糖蛋白，其糖链都是伸向细胞膜的外侧。不同的糖链结构表现出各异的生物学行为。有人将细胞膜上糖蛋白的糖链比做某些电子仪器的发射天线或接收天线，说明多糖在细胞同外界联系、信息交流、识别等方面起重要作用。

第四节　多糖物质的分离和分析

一、糖类物质的分离

1. 预处理

用于进行糖分析、分离的生物材料或样品的成分往往是非常复杂的，除了待研究的糖以外，通常还包含有蛋白质、色素以及其他干扰性的杂质，因此在着手分析、分离前必须设法除去，即有一个预处理问题。在进行预处理和以后的分析过程中十分重要的一点是应该注意避免待研究对象有降解、转化和被吸附等可能引起的损失。例如，对于植物材料常先用80%的热酒精处理，以免组织材料中相应的糖酶引起的降解。对于蛋白质和还原性杂质一般采用10%的中性或碱性醋酸铅沉淀，然后用硫酸钠除去过量的醋酸铅，但血液样品常用硫酸锌、钨酸钠除去蛋白质的干扰；至于有机酸等离子化合物则多用离子交换法进行分离。

2. 可溶性糖的分离和分析

单糖由于它能溶于水，一般可用水抽提，但为了避免将多糖等同时带入提取液中，可用50%或80%左右的乙醇代替水，然后除去乙醇。单糖的测定多用还原糖法，即利用糖使溶液中的Cu^{2+}还原为红色Cu_2O而加以定量。对于己糖可用蒽酮法测定，因为这些糖在浓硫酸作用下生成糖醛，后者能与蒽酮反应定量地生成蓝绿色产物。对于戊糖则可用苔黑酚法，依据的原理是它们在浓盐酸和三氯化铁存在的条件下与黑酚共煮将化学计量地产生蓝绿色产物。对于醛糖，通常采用次碘酸滴定法，即在碱性条件下使碘转变为具有强氧化性的次碘酸，它能与醛糖反应生成糖酸而与酮糖则无此作用，因此通过硫代硫酸钠滴定剩余碘可求知醛糖量。对于酮糖，可在酸性条件下使之与钼酸铵反应生成蓝色化合物，而后在650 nm进行测定。对于氨基乙糖，可在碱性条件下通过加热使之与乙酰丙酮(90 ℃)反应，形成α-甲基吡咯后，再与N,N-二甲基对位氨基苯甲醛反应生成红色产物，然后在530 nm进行测定。

单糖的定性分析与分离多采用纸层析法或硅胶、纤维素薄层层析法，一般以三甲基吡啶做溶剂，以碱性硝酸银为显色剂。此外，也可在硼酸缓冲液中形成带电性的络合物而进行电泳分离，此法可用于单糖、低级寡糖和糖醇等的分离鉴定。

低级寡糖的定量测定：可用2%左右的盐酸在80 ℃左右水解0.5 h，中和后，用还原糖法测定，减去水解前的还原糖量，即低级寡糖量。淀粉等可溶性多糖则常用3%的盐酸在沸水浴中水解4 h，然后同样用还原糖法测定，与水解前的差值即代表多糖值。

糖类的构象测定方法有铜氨络合物法、X射线晶体衍射法、旋光法、红外光谱法、喇曼光谱法以及核磁共振法，其中X射线晶体衍射法是测定糖的晶体构象最好的方法，而对溶液中糖的构象测定来说，最好用核磁共振法。

3. 植物细胞壁多糖组成成分的分离

某些植物细胞壁多糖组成成分的分离可参考图2-16所示的程序进行。

4. 多糖的分离纯化和鉴定

近年来对多糖的深入研究表明，多糖不仅有着多方面的生理功能，而且对工农业生产和

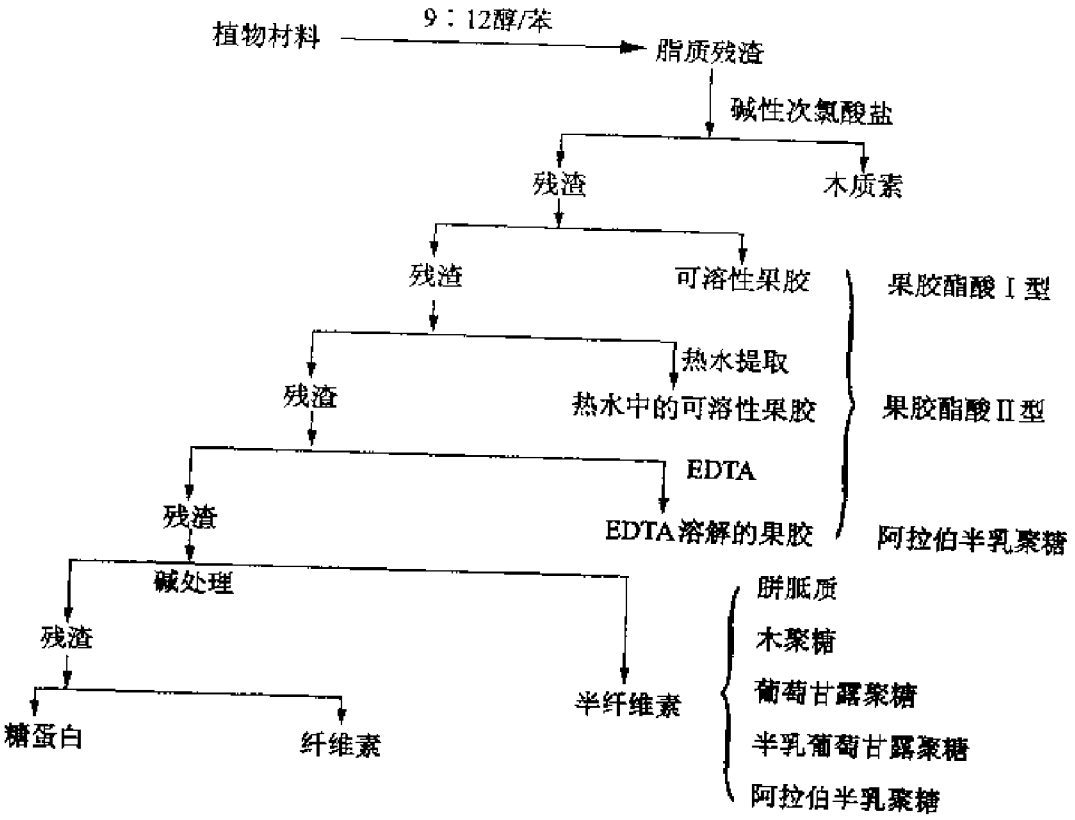


图 2-16　植物细胞壁多糖的分级和组分

医药实践也都有着十分重要的应用价值，为此，多糖的分离纯化和鉴定就成了进一步工作的首要内容了。

多糖可以来自不同生物，可分为胞外多糖和胞内多糖，但它们的分离纯化与鉴定方法却大同小异。

多糖的分离一般包括下述步骤：粉碎，脱脂，通常用甲醇或 1∶1 的乙醇和乙醚水浴回流 1～3 h，然后用水抽提出水溶性多糖，例如用 90～100 ℃的水搅拌抽提 4～6 h，并重复 2～3 次，再继之以稀盐、稀碱或稀酸抽提出相应的盐溶性、碱溶性或酸溶性多糖，例如 0.5 mol/L NaOH 经2～3 次抽提后再通过离心分出上清液，中和，透析，最后加4～5 倍体积的乙醇或甲醇沉淀，即得粗制品。抽提过程应注意的是防止酶、酸、碱降解。在预处理一节中已讨论过如何避免酶的破坏。用酸抽提时为防止酸的作用酸的浓度不宜过高，时间应短，而且不应超过 4 ℃。至于碱抽提，通常的措施是通以氮或加入硼氢化钾或硼氢化钠。多糖的分离也有一些特殊的报道，例如用二甘醇抽提细菌多糖，用二甲亚砜提取乙酰多糖等。

多糖从组织材料中分出后，接下来的工作是脱蛋白。多糖分离的一般规律是：3%左右的三氯醋酸抽提多糖时，抽提液中蛋白质含量较少，稀碱抽提则含量较高。但是在后一情况下，如果有硼氢化钾存在，可以将糖蛋白分开。常用的脱蛋白措施有：(1)蛋白酶(如链霉菌蛋白酶)降解；(2)通过氯仿或氯仿异戊醇振荡变性，三氟三氯乙烷处理；(3)三氯醋酸沉淀。上述办法往往配合使用，如蛋白酶消化后继之氯仿变性分离，而且往往要反复几次才能完成。应

用三氯醋酸时应避免多糖在酸中降解。

抽提液往往需要脱色，特别是植物抽提液由于含有较多的酚类化合物，易氧化产生较深的颜色，碱抽提尤其如此。脱色的办法通常有两种：一是用DEAE纤维素进行分离，因为大多数情况色素呈负离子状况；二是在pH 8左右用H_2O_2。前一种办法的缺点是有时多糖也被吸附，后一情况则是多糖有被部分降解的可能。某些多糖抽提液可以通过加入费林试剂使之生成不溶性铜络合物，然后用离子交换剂分去铜络合物，免去脱蛋白脱色之烦。

多糖抽提物的进一步纯化一般有以下方法：(1)分级沉淀，最常用的是有机溶剂，也可用盐析法；(2)金属络合物法，即用费林试剂或氯化铜、氢氧化钡、醋酸铅等使多糖与铜、钡、铅等生成络合物沉淀，然后用5%(*V*/*V*)的酸乙醇分解；(3)季铵盐沉淀法，这是利用十六烷基三甲基胺的溴化物或其衍生物在pH小于9(无硼砂存在)的条件下能使酸性多糖沉淀的性质，而使其与中性、碱性多糖分离的方法；(4)分级溶解法，这是先让多糖沉淀于惰性的纤维素柱中，然后用不同浓度的乙醇水溶液洗脱；(5)离子交换层析法，常用DEAE-纤维素和ECTEOLA-纤维素进行酸性蛋白和中性蛋白以及粘多糖的分离；(6)分子筛凝胶层析，即利用多糖分子和形状差别进行的分离；(7)电泳分离。

多糖的定性检定可用以下方法：硫酸酚颜色反应；蒽酮颜色反应；红外光谱分析，多糖在3 415～3 280 cm^{-1}和1 665～1 635 cm^{-1}都有吸收带。

多糖的纯度可通过电泳和层析(分子筛层析或DEAE-纤维素层析)检测，显色剂可用p-茴香胺硫酸试剂、甲苯胺兰、高碘酸Shiff试剂等。

为了更好地了解多糖和利用多糖的作用机制和特点，在分离纯化多糖后还需要对它们进行各种分析，包括分子大小、组成成分、糖链的连接方式、糖苷键的类型、侧链基团的鉴定等。

二、糖的定量测定

在进行糖的定量测定时，首先要明确一个概念，就是区别化学计量法(stoichiometric method)和非化学计量法(non stoichiometric method)，因为用于还原糖定量的方法只有少数是化学计量反应(如次亚碘酸法)，而大多数是非化学计量反应(如铜试剂法、硝基试剂法、硫酸或盐酸处理后的比色法等)，也就是写不出化学反应式的反应。铜试剂是应用最早的试剂，早在1848年Fehling就做出了碱性铜液，即硫酸铜碱性酒石酸钾钠溶液，称为Fehling氏试剂。因为硫酸铜在碱性溶液中能生成氢氧化物沉淀，故加入酒石酸钾钠，就能靠它的两个羟基与铜生成络合物而成为澄清溶液，再利用还原糖将Cu^{2+}还原生成Cu_2O沉淀，如此则可以直接称Cu_2O的重量来定糖(即重量法)，也可将Cu_2O溶解再滴定(容量法)定糖，而二者都要查表定量。Fehling测出的为1分子葡萄糖还原5个铜原子，即比值为1∶5，当时认为是正确的。直到1878年，Soxhlet发现糖和还原的铜量不是常数，而是依反应时铜过量的多少而不同，因此利用铜试剂测还原糖的方法都要预先试验，制定出一个经验数据表。例如在1935年第4版AOAC(Association of Official Agricultural Chemists)的《公认和暂定分析法》一书的附录中就有多个定糖表，在第626页上有Munson和Walkers表，按Cu_2O重量相当Cu量和葡萄糖、转化糖、乳糖、麦芽糖等的量列表，共6页，每页上到下40行，每相差Cu_2O 2 mg为一行，从左到右共11列(各种糖)。可以把第一行和最后一行前三列列出来如下：

1行	Cu_2O	10 mg	Cu	8.9 mg	葡萄糖 4.0 mg
末行	Cu_2O	490 mg	Cu	435.3 mg	葡萄糖 237.8 mg

用Cu原子量63.54，葡萄糖分子量180计算出第一行葡萄糖：Cu＝1：7，末行为1：5。这表明铜量过大时被还原的多，铜量过少时被还原的少。

在《糖的物理化学分析》一书(第747页)中有不同糖还原力的差异表，如下所示。

表2-8 不同糖的还原能力

0.0005 g 糖	还原Fehling液mg数	还原力(以葡萄糖为1计)
葡萄糖	105.2	1.000
转化糖	101.2	0.962
果 糖	97.0	0.924
乳 糖	74.0	0.703
麦芽糖	64.2	0.610

由表2-8可见糖的还原力与其所含醛基不成比例，这样的反应就是非化学计量反应，虽然可以有条件地对其进行定量分析，但写不出反应式，只能写成：$2Cu^{2+}$＋还原糖→Cu_2O。

硝基试剂如3,5-二硝基水杨酸(DNS)法也不是化学计量反应，戊糖、己糖和双糖与DNS反应的生色度A_{500}/μmol糖的值分别是：戊糖(木糖、阿拉伯糖)0.42，己糖(葡萄糖、半乳糖、甘露糖)0.46，双糖类(麦芽糖、乳糖)0.65。有人认为还原糖的醛基被氧化为羧基，但当量不准确，不同的糖类产生不等量的色度，表明它的化学反应是较复杂的。但也有人成功地用仅含DNS和NaOH的溶液测定淀粉酶解产物的分子量，即假定从麦芽糖起的麦芽寡糖系列的还原基有相等的还原力，但这还需要用寡糖系列制作标准曲线来确定。本法由于方便，因而被广泛采用。

基于硫酸或盐酸处理比色的方法(如酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法和地衣-酚硫酸法等)可能是由于糖在强酸中脱水生成糖醛或其衍生物，比起3,5-二硝酸水杨酸法更为无规律。即使同为己糖，生色快慢不同，不仅色度不同，颜色也有差异，不同糖的吸收光谱也各不相同。以地衣酚-硫酸法(Bruckner法)为例，果糖、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖的吸光谱如图2-17。

地衣酚-Fe^{3+}-盐酸法(Bial反应)测定戊糖：Bial于1902年发现戊糖和地衣酚、Fe^{3+}及盐酸反应生成绿色化合物，Mejbaum(1939)确定了用此法进行戊糖比色定量法可用于核糖核酸中的核糖定量。磷酸戊糖、各种酮糖和酮糖酸等不同的糖有着不同的颜色，以福井改良法为例，戊糖为蓝色，葡萄糖为淡红色，果糖为黄色。该显色方法对戊糖和庚酮特别灵敏，对甲基戊糖的反应弱，而氨基糖不生色。各种糖的μmol吸光度如表2-9所示。

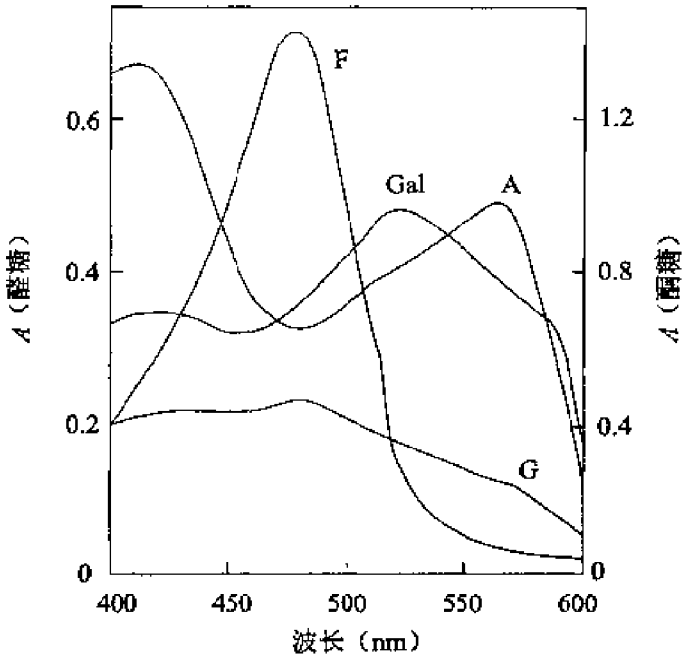


图 2-17　地衣酚硫酸法(Bruckner 法)测定各种糖类的吸收光谱

（加热时间 50 s）

F：果糖；G：葡萄糖；Gal：半乳糖；A：阿拉伯糖

表 2-9　Bial 反应的生色度(福井改良法)　　($A/\mu mol$)

	核　糖	木　糖	鼠李糖	葡萄糖	果　糖
A_{420}	0.15	0.86	0.089	0.040	0.34
A_{540}	0.73	1.20	0.103	0.081	0.11
A_{880}	3.30	2.20	0.140	0.046	0.025

综上所述，用这些方法时要严格按照规定操作，并经常制标准曲线。在测单一的糖时问题不大，当有其他糖存在时则应特别注意。选择不同的波长也可以分别测定不同的糖。

还原糖的化学计量反应仅限于醛糖的次亚碘酸法(过碘酸氧化法也是计量反应，用于2-脱氧糖的定量)。Willstutter-Schudel 法的反应如下式：

$$RCHO+I_2+3NaOH \longrightarrow RCOONa+2NaI+2H_2O \qquad (1)$$

实际上碘在碱性溶液中形成次亚碘酸盐：

$$I_2+2NaOH \longrightarrow NaIO+NaI+H_2O$$

因浓度、时间和温度等因素，有小部分次亚碘酸盐生成碘酸盐：

$$3NaIO \longrightarrow NaIO_3+2NaI$$

当醛糖被氧化完全后，加硫酸酸化，剩余的 I_2 又释放出来：

$$NaIO+NaI+H_2SO_4 \longrightarrow I_2+Na_2SO_4+H_2O$$

$$NaIO_3+5NaI+3H_2SO_4 \longrightarrow 3I_2+3Na_2SO_4+3H_2O$$

在任何情况下，由 1 分子次亚碘酸盐均可得到 1 分子 I_2，释放出来的 I_2 再用硫代硫酸钠

滴定：

$$I_2+2Na_2S_2O_3 \longrightarrow Na_2S_4O_6+2NaI \qquad (2)$$

根据消耗的I_2即可计算出还原糖量。消耗0.1 mol/L 的碘液1 mL 相当麦芽糖17.1 mg(若按水—麦芽糖计算则为18.0 mg)，葡萄糖90 mg，木糖75 mg。本法适用于测定淀粉酶解时糖苷键水解的百分率，也可测定淀粉酶解产物的寡聚糖链长。

化学计量反应只是说反应按一定反应式进行，可以计算反应物的当量，但并不能排除有副反应或其他物质干扰，如在碱性条件下少量葡萄糖可异构为果糖。在测定发酵液中的残糖时，其他发酵产物如丙酮、丙酮酸有干扰，铵盐也有干扰。当用硫酸铵沉淀酶时，应先透析。

以下介绍几种常用的测定方法。

1. DNS 比色法

在碱性溶液中，3,5-二硝基水杨酸(DNS)与还原糖共热后被还原成棕红色氨基化合物，在一定范围内还原糖的量与反应液的颜色强度呈比例关系，利用比色法可测定样品中的含糖量。

该方法是半微量定糖法，其操作简便、快速，杂质干扰较少，尤其适合于批量测定，例如用于糖化酶发酵过程中糖的分析。

若被测样品中含酸，可加入2%的NaOH。显色剂不能放置过久，否则标准曲线会变动。

2. Somogyi-Nelson 法

还原糖将铜试剂还原生成Cu_2O，Cu_2O在浓硫酸存在下与砷钼酸生成蓝色溶液，在560 nm下的光密度与还原糖浓度成比例关系。

此方法重复性较好，产物稳定，测定范围为10～180 μg。

3. 苯酚-硫酸法

苯酚-硫酸试剂可与游离的或寡糖、多糖中的己糖、糖醛酸(或甲苯衍生物)起显色反应。己糖在490 nm(戊糖及糖醛酸在480 nm)处有最大吸收，吸收值与糖含量呈线性关系。

此方法简单、快速、灵敏，对每种糖仅需制作一条标准曲线，且颜色持久。

制作标准曲线宜用相应的标准多糖，如用葡萄糖制标准曲线，应以校正系数0.9 校正糖的μg 数。对其他同多糖亦如此。

对杂多糖，其分析结果可根据各单糖的组成比及主要组分单糖的标准曲线的校正系数加以校正计算，可得较满意的结果。

有颜色的样品易偏高，不理想。

此法适宜于检测凝胶柱部分收集的样品中的相对糖量的分析。

4. 蒽酮-硫酸法

糖类遇浓硫酸脱水生成糠醛或其衍生物，它们可与蒽酮试剂缩合产生颜色物质，反应后溶液呈蓝绿色，于620 nm 处有最大吸收，显色与多糖含量呈线性关系。

本方法可用于多糖、单糖含量测定。色氨酸含量较高的蛋白质对显色反应有一定干扰。

5. 地衣酚-硫酸法

糖经浓无机酸处理，脱水产生糠醛(戊糖)或糠醛衍生物(如羟甲基糠醛)(己糖)，生成物能与酚类化合物缩合生成有色物质。

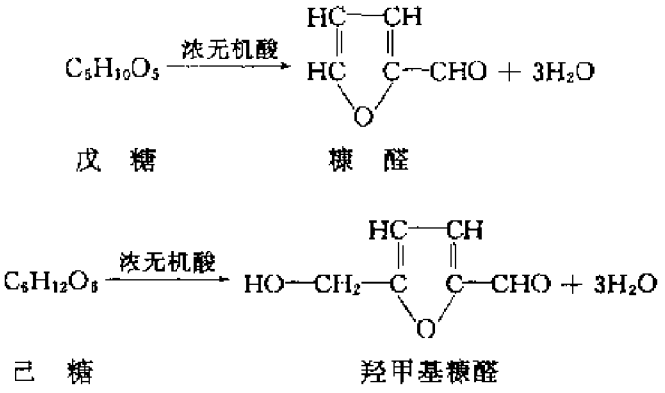


图 2-18 糖与浓无机酸的反应

通常使用的无机酸为硫酸，常用的酚为α-萘酚、地衣酚、间苯二酚等。

该方法操作简便，目前已广泛用于测定糖蛋白中的总糖含量，例如测定葡萄糖氧化酶、α-淀粉酶、黑曲霉葡萄糖淀粉酶、根霉葡萄糖淀粉酶中的糖含量，同时也测定了一些卵蛋白、硫酸软骨素等物质中的糖含量。

该方法的缺点是：氨基糖存在可导致颜色降低，大量的色氨酸存在也可导致一些误差。

该方法对中性糖的测定结果是可靠的。

6. 戊糖的测定（地衣酚法）

戊糖与氯化高铁盐酸溶液或硫酸铁铵盐酸溶液一起加热，再与地衣酚试剂反应，会形成蓝绿色溶液，故可以用比色法定量测定戊糖含量。

该方法可用于测定五碳糖，方法简单。其缺点是灵敏度较低，且因蛋白质、杂糖等干扰不易测准确。

7. 己糖和6-脱氧己糖的比色测定

存在于糖蛋白和蛋白聚糖（糖胺聚糖）中的己糖和6-去氧己糖可分别采用苯酚-硫酸法和半胱氨酸-硫酸法进行比色定量。若代之以苯酚-半胱氨酸-硫酸反应，则既可用于含上述两类糖基之一的同多糖或杂多糖（如糖胺聚糖的硫酸角质素和海参糖胺聚糖）的组成定量，也可以一次呈色，同时测定糖蛋白样品中两种糖基的含量。

本法适用于一种样品的两种己糖（中性己糖和6-去氧己糖）的同时测定，这无疑为测定者提供了方便。另外，就方法的灵敏度而言，以本法测定半乳糖和岩藻糖分别比原型Dubois法和Dische法提高100%和50%以上，这表明本法并非两原法的简单结合，而有其自身特点。据此，可将本法视为一种新法（至少是一种改进法），可取代原型方法用于己糖的单独测定。

当应用本法于两类糖基的同时测定时，必须注意共存糖基间可能发生干扰。Djurdjic 的研究表明，高含量岩藻糖的存在（岩藻糖量10倍于半乳糖）并不影响半乳糖的测定结果；相反，高含量的半乳糖会导致岩藻糖"表观含量"偏高，因此测得吸收值应扣去相应量半乳糖在398 nm 处的光吸收以作校正。

8. 葡萄糖氧化酶法测定葡萄糖

葡萄糖氧化酶专一地氧化β-葡萄糖（在葡萄糖溶液中，α-葡萄糖和β-葡萄糖存在着动态平衡，随着β-葡萄糖的被氧化，最终所有α-型全部转变成β-型而被酶所氧化），生成葡萄糖酸

和过氧化氢。在有过氧化物酶同时存在时，过氧化物酶催化过氧化氢氧化某些物质（如联[邻]甲氧苯胺、联[邻]甲苯胺、酚酞、亚铁氰化钾等），而这些物质氧化后从无色转变成有色，故可通过比色计算出葡萄糖含量。

在绘制标准曲线时，葡萄糖浓度在0～90 μg/mL范围内，标准曲线为通过原点的一直线，若标准曲线不通过原点，适当增加葡萄糖氧化酶试剂中的过氧化物酶浓度即可纠正。

葡萄氧化酶试剂最好现用现配，放置于冰箱暗处可保存半个月。

由于葡萄糖氧化酶液中同时混杂有麦芽糖酶和其他葡萄糖苷酶，如果为达到专一测定糖化酶活力的目的，最好用Tris-甘油缓冲液，因为缓冲液中的两种成分都有抑制麦芽糖酶和其他葡萄糖苷酶的能力。

9. 氨基己糖的比色测定

存在于蛋白聚糖（或糖胺聚糖）及糖蛋白中的N-取代（乙酰基或硫酸基）氨基己糖可通过盐酸水解成游离氨基己糖（氨基葡萄糖和氨基半乳糖）并释出。氨基己糖经碱性乙酰化反应后能与对二甲氨基苯甲醛（PDABA）呈色而进行定量。又由于两种氨基己糖在100 ℃和25 ℃下乙酰化程度不同，可进一步对它们做出鉴别定量。

由于本法对制备标准曲线的氨基己糖采取了和样品平行一致的酸处理，因此可消除因样品水解时部分氨基己糖损失所造成的含量偏低的结果。另外，虽然Blumendrantz和Wagner都称本法亦适用于糖蛋白样品中氨基己糖的测定，但据Beeley建议，这类样品水解液宜先通过强酸型阳离子树脂Dowex500×4（H^+型）并用水洗柱，后再以1 mol/L的盐酸洗脱，经减压脱酸后进行比色测定。

糖胺聚糖中，肝素采用本法测定其氨基葡萄糖含量偏低，提高水解温度或延长水解时间均未改善结果。这究竟是由于肝素分子中N-硫酸基氨基葡萄糖的硫酸基在酸性环境下极易脱落，引起氨基质子化而使氨基己糖糖苷键对抗水解造成水解不全，还是由于强化酸水解条件造成肝素氨基己糖破坏加剧？不得而知。Bhurgava对肝素的氨基己糖测定采用6 mol/L盐酸，95 ℃下3 h的水解条件，另对测定结果给以12%所谓"水解引起损失"的校正值。

10. N-乙酰氨基己糖的比色测定

存在于糖蛋白和蛋白聚糖（糖胺聚糖）中的N-乙酰氨基己糖经各种N-乙酰氨基己糖糖苷酶和糖胺聚糖裂解酶作用出的N-乙酰氨基己糖可利用Morgan-Elson反应进行比色测定。长期以来通用的是Reissig法[见11(2)]。

本法适用于游离的和位于寡糖链还原性端基的N-乙酰氨基己糖的定量分析。

N-乙酰氨基半乳糖在本比色反应条件下的吸收度仅为N-乙酰氨基葡萄糖的35%，因此制备标准曲线所用的标准糖应视所测样品中的N-乙酰氨基己糖品种而定。

11. 用Ehrlich试剂测定氨基糖

(1)Elson-Morgan法测定游离氨基糖（Blix修改法）

[前处理]本法只能测定游离的氨基糖（亦称糖胺），故需预先水解：糖蛋白用4 mol/L的盐酸于100 ℃时水解4 h，粘多糖用4 mol/L的盐酸（封管中）于100 ℃时水解16 h，N-乙酰氨基糖N-乙酰基的水解条件为2 mol/L的盐酸水解2 h。氨基糖在酸水解时会遭到破坏，封管中真空或充氮气可以保护。

[基本反应]

①氨基糖在碱性条件下与乙酰丙酮(Acetyl-acetone)缩合形成生色原(chromogen)2-甲基-3-乙酰吡咯衍生物；

②生色原再与 Ehrlich 试剂对-二甲氨基苯甲醛(p-dimethy-lamino-benzaldehyde，DMAB)在浓盐酸乙醇溶液中生色。

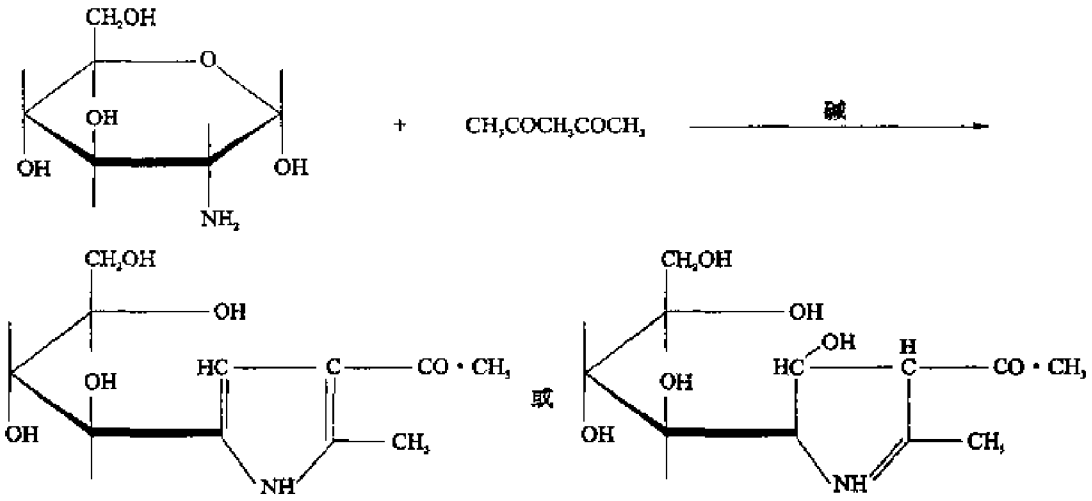


图 2-19　用 Ehrlich 试剂测定氨基糖的基本反应图

2-甲基-3-乙酰-吡咯衍生物＋DMAB→生色(结构不明)

2-甲基-3-乙酰-5-羟基-丁基吡咯或 2-甲基-3-乙酰-4-羟基-5-羟基-丁基吡咯

特点和注意事项：

乙酰丙酮试剂溶于碳酸钠溶液中，盐酸水解的样品需稀释使盐酸浓度在 0.3 mol/L 以下。

大多数己糖胺、戊糖胺在 530 nm 有最大吸收光度，不同糖胺在 530 nm 处的吸光度有差异，以 *D*-葡萄胺为 100，则 *D*-半乳糖胺和 *D*-岩藻糖胺为 92，*D*-木糖胺为 156。

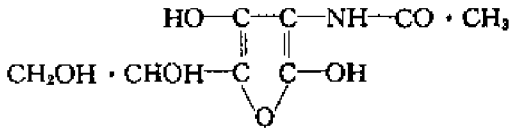
氨基酸或还原糖分别存在时无影响，两者同时存在时——特别是赖氨酸存在时有妨碍。

(2)Morgan-Elson 法(Reissig 改良法)

本法与上法不同之点在于能测定N-乙酰氨基糖，它在弱碱溶液中加热后与DMAB 生成红紫色物质。运用此方法时DMAB 与还原末端的N-乙酰氨基糖残基也有反应，但在 4-位有置换基的则不能反应。

[基本反应]

(1)



N-乙酰葡萄糖胺(呋喃糖形)

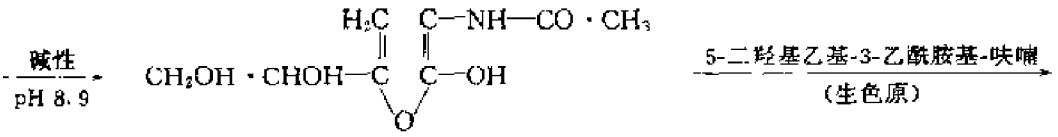


图 2-20　Morgan-Elson 法测定氨基糖的基本反应图

(2)生色原+DMAB→生色(结构不明)。

特点和注意事项：

硼酸盐加热时的pH 对生色度影响很大，最适为pH 8.9。试样的pH 要注意调整。

在585 nm 比色时，N-乙酰葡萄糖胺的分子消光系数为$18\times10^4\sim21\times10^4$，N-乙酰半乳糖胺的分子消光系数为$7.4\times10^3$。

N-乙酰氨基酮糖酸和N-乙酰葡萄糖-6-磷酸与N-乙酰葡萄糖胺有相等的发色度。

N-乙酰葡萄糖胺-1-磷酸若不经水解则不生色。可用0.1 mol/L 的HCl 于100 ℃水解5 min。

还原糖或氨基酸分别存在时不妨碍生色，但二者共存(葡萄糖和赖氨酸各20 μmol)时有干扰。1 mol/L 的NaCl 不影响生色。

如有在硼酸液中不加热也与DMAB 生色的物质存在，则应做一个不加热的空白实验。

12. 己糖醛酸的比色测定

存在于聚糖，包括蛋白聚糖(或糖胺聚糖)中的己糖醛酸经含四硼酸钠的硫酸作用后可进一步与间羟联苯反应，形成有色物质，该物质在520 nm 处有最大吸收。吸收值与该糖的浓度呈良好的线性关系。和同类方法(咔唑-硫酸法和地衣酚-盐酸法等)相比，该方法简便、快速、灵敏度和专一性高。

本法对葡萄糖醛酸、艾杜糖醛酸和半乳糖醛酸的呈色率虽有差异，但十分接近，而甘露糖醛酸的呈色率仅及葡萄糖醛酸的一半。

和其他己糖醛酸比色法不同，本法不受共存的中性己糖和戊糖的干扰。此外，由于本法简便、快速、灵敏，可取代目前通用的Bitter-Muir 改进的咔唑-硫酸法做聚糖液相色谱分离时柱洗脱液的分析。

三、糖的色谱法

1. 糖的纸色谱

单糖、双糖、寡糖、多糖及其衍生物都可以通过纸色谱得到满意的分离鉴定。不同的糖所用的显色剂及溶剂系统也各不相同，例如：寡糖和多糖的纸色谱可采用酸(硫酸或盐酸)水解的方法将其分解成单糖，然后进行纸色谱；也可用某些溶剂系统直接将某些寡糖、多糖分开，然后检出。现将溶剂系统和检出方法介绍如下。

(1)溶剂系统：下表列出了某些常用于寡糖和多糖色谱的溶剂系统。

表2-10　用于寡糖和多糖色谱的溶剂系统

溶剂系统	糖种类
正丁醇：乙醇：水＝10：1：2(*V*/*V*)	寡　糖
正丁醇：乙醇：水＝4：1：5(*V*/*V*)	寡　糖
乙酸乙酯：吡啶：水＝8：2：1(*V*/*V*)	寡　糖
正丁醇：吡啶：水＝6：4：3(*V*/*V*)	寡　糖
杂醇油(b. p. 121～139 ℃)：吡啶：水＝1：1：1(*V*/*V*)	寡　糖
正丁醇：吡啶：水：苯＝50：30：30：4.5(*V*/*V*)	棉籽糖
25%的丙醇溶液在0.067 mol/L的磷酸盐缓冲液中(pH 6.4)	粘多糖
75%的异丙醇(*V*/*V*)：乙醇＝9：1(*V*/*V*)	直链淀粉

(2)斑点的检出

①鉴定含有酮糖的寡糖用改进的Seliwanoff试剂。

②鉴定棉籽糖可用α-萘酚试剂。

③鉴定直链淀粉用苯胺-邻苯二甲酸试剂。

④鉴定还原性多糖用Somogyi试剂。

⑤鉴定粘多糖用甲苯胺蓝试剂。

⑥鉴定淀粉用1%的碘乙醇溶液。

2. 糖的柱色谱

主要有糖的活性炭柱分离、糖的离子色谱法分析。

(1)糖的活性炭柱分离

早在20世纪40年代初，活性炭柱色谱法就用于分离糖类。50年代初，Whistler等将其做了改进，采用乙醇溶液的梯度洗脱，使单糖、二糖、三糖、四糖和五糖之间得到分离。这个方法的特点是：

①分离容量大，150 mL活性炭-硅藻土可分离1 g混合糖。

②适用范围广，不但可用于不同聚合度的低聚糖(如木糖、木二糖、木三糖等)之间的分离，也可用于同聚合度的不同寡糖(如蔗糖、麦芽糖、纤维二糖……)之间的分离，还可用于混合糖、糖酸、糖醇和糖的乙酰酯、氨基低聚糖及糖的甲基醚的分离。

③糖样中含有无机盐对分离没有影响，糖样溶液的浓度也无关紧要，通常可以是1%～10%。

混合糖样被完全分离后，合并相同组分的洗脱液，在旋转薄膜蒸发器上除去溶剂(在40 ℃下)。若得到的是糖浆，则可加一些无水乙醇溶解，之后再行蒸去，如此反复3～5次，常可得到白色粉末状固体，干燥后可计算粗收率。最后重结晶，干燥，计算收率，测定比旋度。粗产物的精制亦可分别再次上柱分离。

活性炭的产品种类甚多，每种活性炭在使用前又可能经过不同的处理过程，因此吸附性能差别很大，这就造成所用的洗脱液的配比有一定变化。

(2)糖的离子色谱法分析

糖的离子色谱法分析是由Rocklin等在1983年首先报道的。此方法根据糖的弱酸性和电化学活性，以阴离子交换色谱柱(AE)分离多种糖，同时用脉冲安培检测器(PDA)测定其

含量。AE-PAD 法自问世以来，取得了令人瞩目的进展。该方法对单糖、寡糖和多糖均有很好的分析结果，检出限小于10^{-9} mol/mL，测定分子量达到3 500以上。其分析过程中样品前处理简单，毋须衍生化，具有很好的实用性。

中性糖的 pKa 一般在 12～14 之间，这些糖分子在强碱溶液中(pH＝12～14)是部分或全部离子化的，因此，当以强碱性的NaOH 为淋洗液时，糖分子可以用阴离子交换色谱柱分离。

传统的大孔阴离子分离柱在强碱淋洗液条件下，性能不稳定，而且柱子不能承受高压，淋洗液的流速必须低于 1.0 mL/min，不适合糖类分子的分离。

Dionex 公司的Carbopac ™PAI 是专门用于分离糖的一种新型薄壳型阴离子交换柱，其树脂结构如图2-21。这种分离柱的优点是承受的pH 范围广(pH 0～14)，性能稳定，柱效高，平衡时间快，使用寿命长。

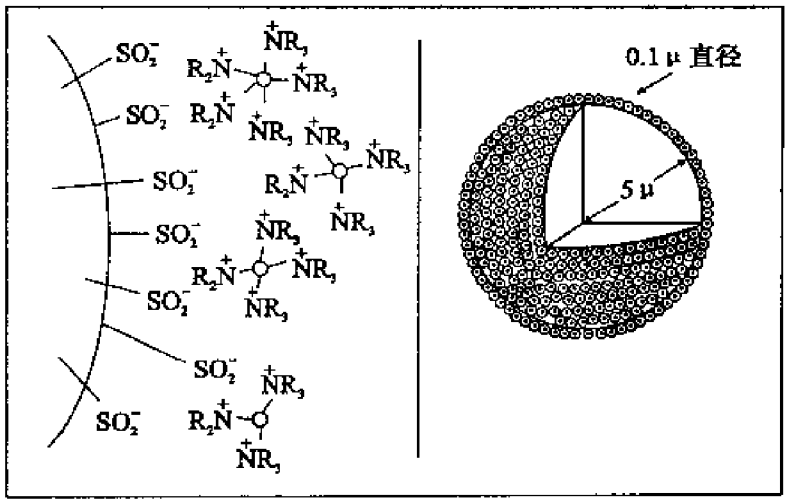


图 2-21　Carbopac PAI 分离柱交换树脂

用阴离子交换色谱法分离中性糖的方法中，改变淋洗液的种类和浓度是提高柱子选择性的最佳方法。一般来说，糖类分子对阴离子交换树脂的亲合力顺序如下：糖醇＜单糖＜双糖＜寡糖，因此，对寡糖应用较强的洗液。一般以NaOH 和NaAc 的混合溶液作梯度淋洗，其中Ac^-是一个比OH^-离子强的淋洗离子。对单糖分离则需用弱的淋洗液，一般是10 mmol/L 的NaOH。为了保证梯度淋洗时的基线稳定，避免脉冲安培检测器在低浓度的NaOH 条件下灵敏度降低，分析单糖时，柱后需要加入 300 mmol/L 的 NaOH 溶液，混合后再进入检测池。单糖的结构比较相似，其分离洗脱顺序主要与单糖的pKa 值有关。pKa 值越大，单糖的离子化程度越低，保留时间越短。糖pKa 值是由其—OH 的数目和活泼性决定的，一般1—OH 位置活泼性最强，其他各位的羟基在低浓度的NaOH 溶液中的活泼性为1—OH＞2—OH＞6—OH＞3—OH＞4—OH。

糖分子在碱性溶液中是电化学活泼性物质，在适当的外加电压下，糖分子在电极表面发生氧化反应，因此，可以用电化学检测器测定。1981 年Hughes 和Johnson 首次提出用脉冲安培检测器测定糖，并取得了成功。

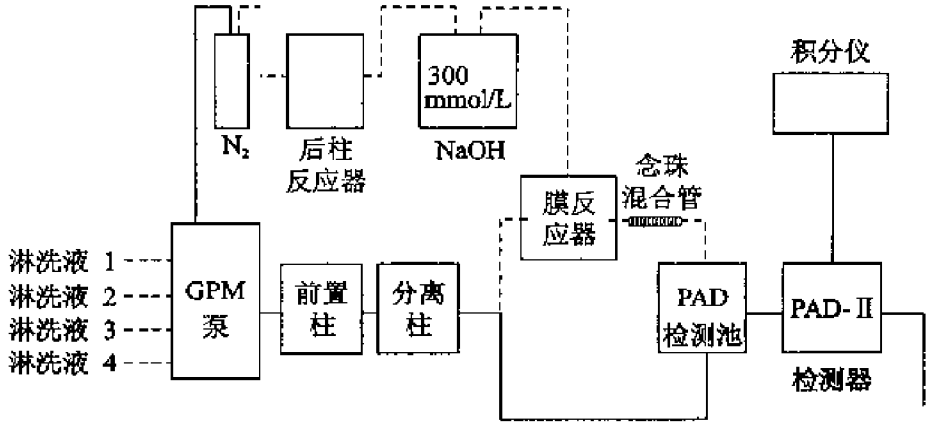


图 2-22　离子色谱分析糖的流程图

与液相色谱法相比，离子色谱法分析糖的种类多，分离效果好，样品前处理简单，脉冲安培检测器比示差或紫外光检测器的检测灵敏度提高 1 至 3 个数量极。

在淋洗液的配制过程中要避免 CO_2 的溶入，因为 CO_3^{2-} 离子对阴离子分离柱来说是一个很强的淋洗离子，它的存在使被测组分的分离效果明显降低，因此，NaOH 和 NaAc 应为优级纯试剂，且NaOH 在使用时要先配成50%(*W*/*W*)浓度比的储备液。在使用NaOH 储备液配制淋洗液的过程中应注意以下三点：

①50%的NaOH 储备液中，CO_3^{2-} 离子大部分存在子溶液的底层和最上层，因此，使用移液管取液时，应从溶液中间层吸取，并尽量减少移动和振动。

②储备液使用后应及时封闭，尽量避免与空气中的 CO_2 接触。

③储备液消耗掉 2/3 后，不应再使用。

淋洗液在使用过程中也要注意排除CO_2。在淋洗液进入泵系统之前，先接通一个脱气装置，以氦气将淋洗液中的 CO_2 不断排出，保证进入分离系统的 CO_2 浓度最低。由于氦气价格昂贵，可改用下列措施排除淋洗液中的CO_2。在配制淋洗液之前，去离子水应先煮沸10 min，使水中大量CO_2 被赶出，冷却后再用于配制。淋洗液配好后，再用超声波脱气10 min，方可使用。这样基本上可以排除 CO_2 的干扰，保证检测的线性关系和重现性。

3. 糖的气相色谱

采用气相色谱测定糖类开始于1958 年。气相色谱分析主要是利用试样中各组分在色谱柱中的气相和液相间的分配系数不同，当气化后的试样被载气带入色谱柱中运行时，样品组分就连续不断地在移动的气相和固定的液相之间进行反复多次的分配，经过一定的柱长后，便分别按分离顺序离开色谱柱进入检测器，检测器产生的讯号经放大后，在记录器上描绘出色谱峰，成为各组分定性定量的依据。

用气相色谱法测定糖类，由于样品在气相中传递速度很快，加上可以选用广泛的固定液和采用灵敏的检测器，因而具有选择性强、分辨力好、灵敏度高以及分析速度快等优点。近几年来，因毛细管色谱柱和程序升温技术的普遍使用，使糖类的气相色谱测定方法得到更为广泛的应用。

采用气相色谱法测定糖类遇到的主要困难是糖类本身没有足够的挥发性，因而必须在气相色谱分析之前预先转化成易挥发、对热较稳定的衍生物。另外，由于糖的异构化，在某些衍生物的制备过程中，会产生衍生物的异构体，使色谱分析时每种糖产生几个峰，这往往影响组分的分离和定量。在分析组分较复杂的样品时，应选择适宜的衍生物制备方法，以使每种糖得到单一的色谱峰。

在糖类的气相色谱分析中，目前常用的衍生物有糖的三甲基硅醚衍生物、糖肟三甲基硅醚衍生物、糖腈乙酸酯衍生物、糖醇乙酸酯衍生物和三氟乙酸酯衍生物等。

糖的硅醚化衍生物具有挥发性好、制备简便、反应迅速的优点。该法适宜结晶糖样和组分简单的糖样的测定。测定结晶糖样往往可以得到单峰，测定糖浆或非结晶糖样则会产生异构峰，给定性和定量带来一定困难。

使用六甲基二硅氮烷和三甲基氯硅烷进行硅醚化反应会有氯化铵产生，使吡啶溶液变混浊。氯化铵的存在一般对色谱分析没有影响。静置或用离心法可使氯化铵沉淀。

在气相色谱分析时，为了减少吡啶峰的"拖尾"，可在硅醚化反应后，对反应产物用氯仿萃取法进行后处理，取衍生物的氯仿溶液进行气相色谱分析。

制备酮糖的三甲基硅醚衍生物，使用同样的硅醚化试剂需要80 ℃反应1 h或在室温下放置4 h以上反应才能完全。

当糖样在吡啶中不易溶解时，可置于70 ℃水浴中加热并振荡使其溶解，但这对结晶糖样制备衍生物时的异构化现象会有所加剧。

水分能迅速与硅醚化试剂作用，使其失去硅醚化反应能力。在衍生物制备时，通常要求使用干燥的样品并注意防止水分的进入。适当加大硅醚化试剂对糖样的用量比例，可使样品的允许含水范围有相应的增加。

测定由糖的水溶液制备的样品时会有异构峰产生。在组分定量时，可配制标准单糖水溶液，放置24 h，待糖的异构体达到平衡后，再将其干燥并衍生化，测得每种糖的重量校正因子和异构体出峰面积的比例，这样在定量多峰和重叠峰时就能得到正确的结果。

采用小型反应容器，可相应减少样品和试剂的用量。

本实验的气相色谱操作条件对测定单糖较为适宜，测定二糖和三糖也可采用程序升温。

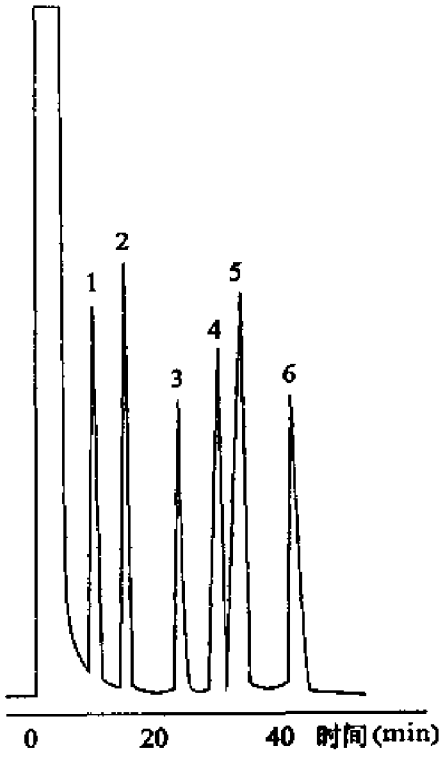


图2-23 糖的三甲基硅醚衍生物在SE-30柱上的出峰图

1. 阿拉伯糖 2. 木糖 3. 甘露糖
4. 半乳糖 5. 葡萄糖 6. 正二十烷(内标)

使用氢火焰离子化检测器测定糖的三甲基硅醚衍生物时，产生的SiO_2容易附着在检测器的电极上，因此对检测器需定期清洗。

有关复合硅醚化试剂的反应条件，一般在商品说明中均有介绍。

4. 糖的高效液相色谱

高效液相色谱(HPLC)是在经典柱色谱和气相色谱的基础上发展起来的仪器化液相柱

色谱，流动相在高压输液泵的驱动下，在色谱柱中与高分离效能的固定相做相对运动，由于样品中不同组分在流动相和固定相之间的分配系数不同，因此，这些组分在两相间反复多次地进行平衡分配，造成差速迁移而彼此分离。各种组分依次随流动相流出色谱柱进入检测器，在检测器中依其物理特性（如光学性质）或化学特性（如氧化还原性质）而被定量地检测。由记录仪将组分的保留特性及相对含量以洗脱曲线的形式记录下来，其出峰时间和峰面积（或峰高）作为各组分定性定量的依据。

根据固定相对溶质保留的机理不同，HPLC 可分为吸附色谱、分配色谱、离子交换色谱、凝胶色谱和亲和色谱等；按固定相与流动相之间相对极性的大小，HPLC 可分为正相色谱和反相色谱。

高效或高速液相色谱（HPLC）分离速度快（分离时间不超过 1 h），分辨率高，分离效果好，重现性好和不破坏样品。HPLC 系统包括高效溶剂输送泵，进样阀，装填有颗粒状（3～10 μm）树脂或硅胶的高效柱和高效检测系统（见图 2-24）。这些系统均是在高压下运行的，其压力大小根据静止相及流动相、柱内载体以及流速决定，通常压力的允许范围为 1～30 MPa。

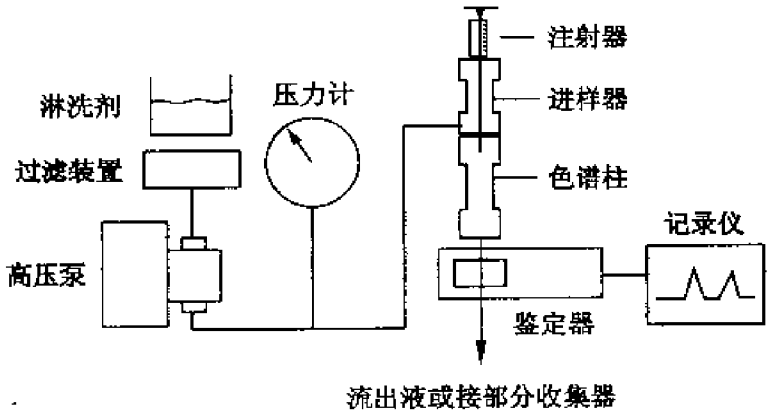


图 2-24　高效液相色谱装置图

糖的高效液相色谱分析在 20 世纪 70 年代就开始研究，多年来已取得较大的进展，成为常量及微量单糖和寡糖重要的分离分析方法之一。到目前为止，其有两种通常采用的方法：一是使用化学键合固定相，以乙腈-水或乙腈-甲醇-水作为流动相，单糖或寡糖由示差折射检测器检测。为了提高检测的灵敏度和分辨率，糖类经带有紫外或荧光标记的衍生化后，用硅胶为固定相，以正己烷-二氧六环为流动相，在紫外或荧光检测器上检测单糖或寡糖。另一种方法是以离子交换树脂或凝胶作固定相，水或盐溶液为流动相，用示差折射检测器或采用柱后衍生化方法，用可见光、紫外光或荧光检测器检测，以提高检测灵敏度，从而有可能发展为糖的专用分析仪器。

糖类的 HPLC 直接检测常用的示差折射检测器易受流速、压力和组分改变的影响，所以选择的高效输送泵应具无脉冲和精确计量的流速控制系统。糖类在常用紫外区域和可见光范围没有吸收也无荧光，但单糖在 188 nm 有最大吸收，寡糖在 210 nm 以下也有吸收，面这些区域噪声大，需用超纯度的溶剂，从面限制了它的应用。为了解决单糖及寡糖的检测问题，

发展了柱前、柱后衍生化方法，即将样品在柱前或柱后制备成种种对紫外光敏感或具荧光的衍生物。

无论采用何种方法和何种仪器，为了获得满意的结果，展层的溶剂均必须去气以及经过孔径小于0.5 μm的过滤器过滤。去氧的方法有加热、减压或超声波处理。目前已有专门的去氧装置可供使用。为了延长柱的使用期，防止样品对分析柱的污染，一般均在柱前装置预置柱或保护柱。现在所用的分析柱直径大多为8 mm，长为30 cm。

今后，糖类的HPLC将向三方面发展：一是继续研究更加耐用和稳定的静止相，二是发展糖类的制备性HPLC，三是HPLC与NMR或MS联用。

5. 糖的薄层色谱

薄层色谱法的原理与柱色谱、纸色谱法基本相同。当作为流动相的液体从由液体或固体组成的固定相的间隙中通过时，由于试样中的各组分在固定相和流动相之间的分配系数不同，随着流动相的移动各组分彼此互相分离开。

薄层色谱法按照机理可分为吸附、分配和离子交换三种，依技术特点又可分为一次展开、双向展开、多次展开、连续展开等。

薄层色谱法设备简单、操作方便，是一种快速、微量的分离技术，因此被实验室广泛采用。

分离糖的薄层色谱有硅胶色谱、纤维素色谱、硅藻土色谱及氧化铝色谱。由于糖是多羟基化合物，极性强容易吸附，多采用含有无机盐的水溶液制备硅胶薄板，使硅胶薄层吸附能力降低、斑点集中，从而对分离有所改善，样品承载量也可有显著提高。

薄层显色后，将样品图谱与标准样图谱进行比较，参考斑点颜色、相对位置及R_f值或R_G值，确定样品中有哪几种糖。

经过薄层分离后的糖可以在薄层上直接定量，如用薄层扫描或者将斑点洗脱后比色测定。

四、糖的电泳法

电泳技术是指以电场为驱动力的一类分离分析手段。它们依据样品于一定分离介质中在电场E作用下所表现出来的速度V及其差异来分离。V称为表观迁移速度，其单位电场值称为表观淌度μ，可一般地表示为：

$$\mu=V/E=\frac{\mu_{EM}+\mu_{OS}+K\mu_{SP}}{1+K} \tag{1}$$

其中$\mu_{SP}=(\mu_{EM})_{SP}=\mu_{OS}$，是具有色谱固定相功能之介质部分的表观淌度；$K$是容量因子。$\mu_{EM}$和$\mu_{OS}$分别为有效淌度和电渗率，可表示为：

$$\mu_{EM}=\sum\alpha_i\mu_i=\sum 2\alpha_i\varepsilon\xi/(3\eta) \tag{2}$$

$$\mu_{OS}=\varepsilon\xi_{OS}/\eta \tag{3}$$

α_i为粒子第i级的解离度，ξ_i为此级离子之全解离电动电位，ξ_{OS}为不移动固体表面的电动电位，ε和η为介质的介电常数和粘度。不同离子的μ_{EM}不同，故能分离；中性组分在μ_{OS}或μ_{SP}不同时为零时可根据K分离。电泳分离效果取决于E、系统散热和介质条件：E高即V大而分离快，但发热也快，散热差时可致分离失败；介质条件影响α、K、ε、η、ξ等，从而影响μ及分离情况。

电泳分离系统一般由电源、电极与电极槽、恒温分离室(包括加样装置)及检测器等部分组成。分离室填有一定功能的分离介质(亦称电泳载体),如自由溶液、各种凝胶或纤维素、海沙等固体物质,其中以琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶及纤维素等在糖及糖复合物分离中应用最多。

电泳技术变化很多,尚无统一的分类标准,各技术的归类及称呼颇有差异。以分离室形状来分类,可用于糖及糖缀合物分析的方法有柱电泳、薄层电泳和毛细管电泳(CE)三类。CE 是20 世纪80 年代发展起来的一类新型的高效、快速、微量的仪器化电泳技术,常用自由溶液介质,能分离离子和中性组分[参见(1)式]。柱和薄层电泳亦称经典电泳,多用凝胶或纤维素介质,只能分离离子成分,一般按电荷分离,要求 $\mu_{OS}=\mu_{SP}=0$;若用聚丙烯酰胺凝胶为介质,因其空间网络具有"分子筛"效应,可按离子的大小分离。

经典电泳和CE 有三种基本分离模式:等速分离、区带洗脱和等电聚焦。等速分离用不连续介质——前导电解质 L 和终末电解质 T,L 中与样品同号的离子最快而 T 中的最慢,样品居于 L 与 T 之间,分离后紧密相连并以 L 中同号离子的速度迁移;区带洗脱用连续介质,样品按各自的 V 独立迁移,形成分立的区带;等电聚焦用pH 梯度介质,适合于分离糖蛋白等两性离子,此种离子的 μ_{EM} 随pH 变化,在等电点pH 即pI 为零时,利用pI 差及 $\mu_{OS}=\mu_{SP}=0$ 的条件,可使之停止在不同的pH 处。这三种分离均始于移界电泳,区带顺序都由 V 决定:V 大的在前,V 小者居后。详细过程示意于图。

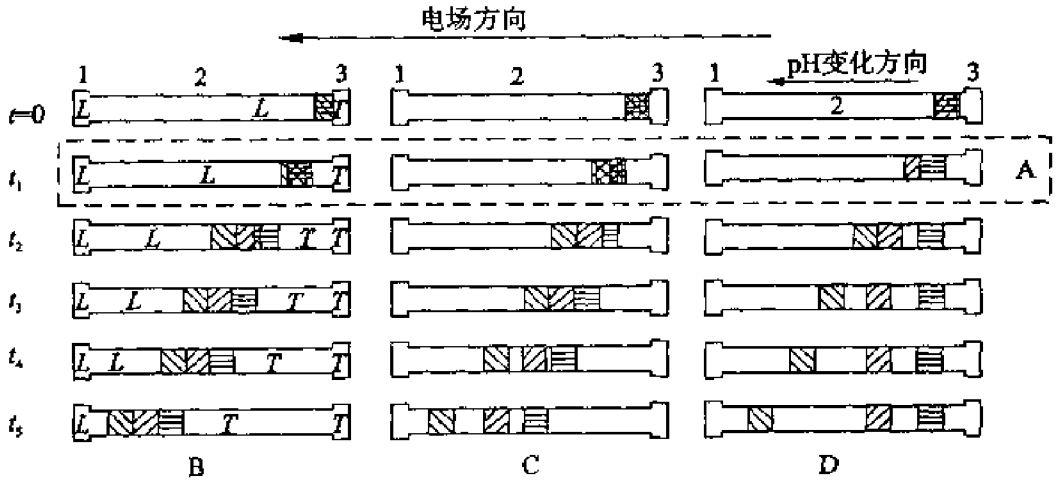


图2-25 电泳技术的基本分离模式

A——移界分离;B——等速分离;C——区带洗脱;D——等电等焦;t_1:分离时间;1、3:电极槽;2:任意形状分离室

样品速度: ▨ > ▨ > ▤ ,▨、▤ 为两性离子。

1. 多糖的滤纸电泳

中性多糖带净电荷少,导电性弱,在电场中移动速度慢,常采用较高电压或电泳时间稍长,才能收到较好效果。

电泳采用的缓冲液以硼酸盐较普遍,因糖类物质中的相邻羟基易与硼酸离子结合,生成硼酸复盐,以增加其导电性。根据多糖的不同特点,也常采用醋酸盐缓冲液、巴比妥缓冲液

等。染色剂常用甲苯胺盐、茴香胺、高碘酸西夫试剂、阿利新蓝、碱性硝酸银等。

2. 多糖的玻璃纤维纸电泳

玻璃纤维纸：GB60 或 Whatman GF 83。

缓冲液：硼酸盐缓冲液(0.025 mol/L)，pH 10.2。

染色剂：p-茴香胺硫酸试剂(1%茴香胺溶液，用浓硫酸滴加至中性)。

将玻璃纤维纸剪切成 5 cm×20 cm，样品(可用 0.4%的葡聚糖水溶液)另点在 1 cm×10 cm的玻璃纤维纸条上(用此纸条浸渍样品，或点加样品至纸条上都可)，然后将此样品纸条紧贴在基线处，使样品下渗至电泳纸条上，移去样品条。于 80 V 电压下电泳 40 min，取出纸条，自然晾干。喷雾染色剂茴香胺硫酸溶液，于 100 ℃烘烤 15 min，显棕黄色均一色斑。若样品不均一，则色斑较宽，显色不均一。

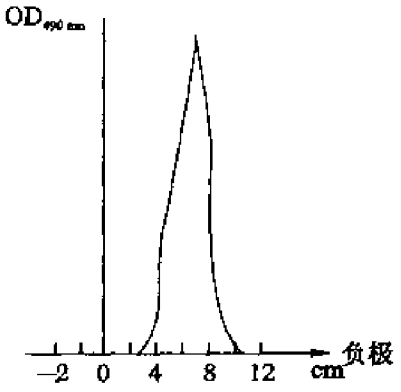


图 2-26 葡聚糖玻璃纤维纸电泳

或者将玻璃纤维纸切成 28 cm×11 cm，多糖样品点样成线(用载玻片)，于400 V 电压下电泳30 min。取出玻璃纤维纸自然晾干后，切分成1 cm 宽条，用1 mL 水洗涤，用酚硫酸法测多糖含量，如样品纯，则为一单峰。若样品分子量在130 万左右，在上述条件下，峰值位于自基线向负极 7.0 cm 处，如图 2-26 所示。

玻璃纤维纸较疏松多孔，点样时要避免扩散。

在上述或类似实验条件下，用不同种类葡聚糖得到向阴极移动的结果。

如电泳中温度上升，应采取冷却装置。将电泳槽放置于冰箱中进行，效果也较好。

3. 多糖的醋酸纤维薄膜电泳

醋酸纤维薄膜。

缓冲液：0.025 mol/L 的硼酸盐缓冲液，pH 12.5。

染色剂：0.5%的甲苯胺蓝溶液。

取醋酸纤维薄膜(2 cm×8 cm)放在缓冲液中浸泡15～20 min。取出膜条，夹在两层滤纸内吸去多余的缓冲液。另切1 mm×5 mm 薄膜浸渍样品溶液约 1 μL(10 μg)，紧贴在离膜条一端2 cm处，使膜条点上细条状的多糖样品。然后按一般常规电泳方法，两端用纸搭桥，电压 250 V，电泳时间 20 min。取出膜条晾干后，在甲苯胺蓝溶液中浸泡染色 10 min，然后在90%的乙醇或1%的醋酸中漂洗，直到无糖区底色脱净为止。如用人参果胶(含有半乳糖醛酸的酸性杂多糖)染色得蓝色色斑。

4. 多糖的凝胶电泳

(1)琼脂糖(agarose)电泳

琼脂糖制板(5.0 cm×7.5 cm)，0.1 cm 厚。可直接用0.5%的琼脂糖溶液或将0.9%的琼脂糖溶液以 0.06 mol/L 的巴比妥缓冲液(pH 8.6)稀释至0.5%制板。

缓冲液：0.06 mol/L 的巴比妥缓冲液或0.05 mol/L 的乙二胺缓冲液(pH 8.5)

染色液(脱色用)：可用醋酸：乙醇：水=0.1：5：5。

(2)聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶垂直管型盘状电泳也曾试用于中性多糖，用高碘酸西夫试剂染色，可得紫红色带，如多糖分级不好，则色带宽，色不均一，如有游离蛋白未除尽，一般移动速度较快，呈现较深的紫色窄带。

缓冲液：Tris-HCl 缓冲液，pH＝9.1。

指示染料：溴酚蓝。

染色剂：凝胶用高碘酸西夫试剂染色。

点样用样品胶：电压500 V，电泳 2 mA/管，时间 2.5 h。

多糖或糖蛋白的聚丙烯酰胺电泳后，也可用麝香草酚溶剂混合物染色。先把胶条浸入0.2%的麝香草酚溶液中，然后浸泡在80%硫酸与20%乙醇的混合物中，多糖或糖蛋白显红色。

如为硫酸软骨素类，可用0.1%的阿利新蓝(Alcian blue)在0.6 mol/L 的HCl 中染色，以后用7%的醋酸、0.6 mol/L 的 HCl 漂洗。

聚丙烯酰胺凝胶板状电泳同样适用。

5. 单糖的高效毛细管电泳

单糖在水溶液中解离能力极差，必须在强碱条件下才能带上电荷，这种条件过于苛刻。为让单糖能在较低的pH 下带上电荷，可使用含硼酸盐的电泳缓冲液。硼酸根能与糖上的羟基发生络合，使其带上足够的负电荷，以实现电泳迁移。单糖上羟基的取向与数量直接影响单糖与硼酸盐络合的稳定性，从而影响其电荷量，即不同单糖在相同介质条件下与硼酸盐的络合物具有有效淌度差异，这种差异已足以被毛细管区带电泳所分辨开。用毛细管区带电泳分析单糖的另一个问题是单糖的紫外吸收很弱，需要采用各种方法使其带可检测基团。例如采用α-萘胺为衍生试剂使单糖带上紫外吸收基团，效果良好。

在 206 nm 波长下采用 α-萘胺衍生试剂，其单糖衍生物在实验装置下的检测浓度可达 10^{-6} mol/L 或更小。α-萘胺衍生方法不仅适用于醛糖，也适用于酮糖(包括N-乙酰氨基糖及糖醛酸)。此方法操作快速简便，衍生物与过量衍生试剂的分离极为方便。

电泳的各种条件如电压(电流)、环境温度、进样量、毛细管长度和内径等都对分离有影响，但当上述条件固定后影响单糖分离能力的关键因素主要是缓冲液的pH 和浓度。

用硼酸或硼砂缓冲液测定表明，单糖混合物的分离度一般随pH 增加而增大。用硼酸缓冲液时，在pH 3.00～3.75 之间有一较好的分离结果，然后分离度随pH 上升而迅速下降，在pH＝5 前后分离度接近零，pH 继续升高分离度又增加，但出峰顺序会有不同。硼砂难以配成酸性缓冲液，其最佳分离条件在pH 9.5～10.5 之间，pH 继续升高分离度下降，出峰变慢，并存在CO_2 干扰问题。在碱性条件下，pH 相同时硼砂缓冲液的分离度高于硼酸，所以在碱性条件下选硼砂为好，但在酸性条件下应选用硼酸。

增加缓冲液中硼酸盐的浓度，能比较有效地增加分离度，不过单糖出峰时间亦有所延长。另外，随着硼酸盐浓度的增加，电泳电流也在增大，即热效应增大，这会导致基线噪音和漂移增大、峰高下降。当缓冲液浓度太高、电流过大时，会导致分离下降，甚至产生气泡，使实验报废。较适合的硼酸盐浓度范围在25～100 mol/L 之间。

6. 酸性多糖与寡糖的等电聚焦和聚丙烯酰胺凝胶电泳

酸性多糖分子在一定pH 的缓冲体系中解离而带电，带电的离子在电场的作用下向一

定的方向泳动，电荷和分子大小决定了分子泳动速率。提高不连续pH聚丙烯酰胺凝胶电泳系统的分离胶的浓度，可以使线性酸性多糖分子像球状蛋白分子一样在电场的作用下实现分离。不同的酸性多糖和寡糖的解离常数不同，在高pH时，大多数酸性多糖和寡糖均能解离，当pH逐渐变小时，解离的分子越来越少，当pH足够小时，有些多糖完全不解离而沉淀下来。等电聚焦就是根据酸性多糖解离度不同而实现分离的。

无论是Tris-盐酸不连续pH系统还是Tris-硼酸-EDTA连续pH系统，在胶浓度合适的前提下，均能把不同大小的酸性多糖或寡糖分辨开，分子小的分离效果比分子大的好，但在胶浓度相同时Tris-盐酸不连续pH系统分辨小分子酸性寡糖所需凝胶的长度比Tris-硼酸-EDTA连续pH系统短。

两种电泳系统，均要求样品体积要小，一般不超过20 μL，而Tris-硼酸-EDTA连续pH系统不能超过10 μL，否则区带压缩不好，影响分辨力。

此法不适用于太小分子的酸性寡糖（四糖以下），小分子难被固定。

对分子大的酸性多糖，采用pH高的两性电解质；对分子小的，采用pH低的两性电解质。可用pH范围较大的两性电解质预电泳来估计分子大小。因为酸性糖不是两性分子，一般在较高的pH条件下解离，因此加样尽量在阴极进行，以便让所有分子都进入胶，而且向阳极移动。

五、多糖的纯度鉴定

复合多糖是大分子化合物，它的纯度标准不能用通常小分子化合物的纯度标准来衡量，因为即使是多糖纯品，其微观也是不均一的。它的纯度只代表某一多糖的相似链长的平均配布，我们通常所说的多糖纯品实质上是一定分子量范围的均一组分。纯度鉴定通常有四种方法：比旋度法、超离心法、高压电泳法及凝胶过滤法。前三种方法误差较大，所以必须要有两种以上方法的结果才能肯定其均一性。目前最常用的且较正确的方法是属于第四种方法的HPLC方法。

1. 比旋度法

不同的多糖具有不同的比旋度，同时在不同浓度的乙醇中具有不同溶解度，所以如多糖水溶液经不同浓度的乙醇沉淀所得沉淀物具有相同比旋度，则证明该多糖为均一组分。

2. 超离心法

微粒在离心力场中沉降的速度与微粒的密度、大小与形状有关。如果某一多糖在离心力场作用下形成单一区带，则说明所有微粒具有相同沉降速度，也就表明其分子的密度、大小和形状相似。

3. 高压电泳法

多糖在电场作用下，按其分子大小、形状及其所带电荷的不同而移动不同的距离。中性多糖虽不带电荷，但它的分子中若有顺式的邻二醇，就能与硼砂形成复合物而带电荷。不同多糖的位阻因素决定了多糖与硼砂形成不同的复合物，所以在电场作用下，多糖的相对迁移率常因复合物的不同而不同。载体一般用玻璃纤维纸，这种载体电渗作用较大。对于中性多糖，它的硼砂复合物的电渗作用大于电泳作用，所以其总的电泳方向是向负极移动的。

玻璃纤维纸上点样浓度很重要，太稀不显色，太浓会拖尾巴，所以必须预先试验浓度。目

前玻璃纤维纸均是进口的，若没有，则可用纯丝的绸布代替之，但事先须将绸布充分洗涤。酸性多糖还可以用聚丙烯酰胺凝胶电泳或纤维素醋酸酯薄膜电泳鉴定。

4. 凝胶过滤法

凝胶过滤法又可称凝胶柱层析法。由于凝胶具有一定孔径大小，故不同形状和大小的多糖分子在凝胶层析柱中的移动速度不同，其规律是较大分子移动得较快，较小分子移动得较慢。流出液经示差检测仪检测，如只有一个对称的峰，则表明为均一组分。凝胶层析法可分为常压柱层析及高压层析两种。常压柱层析的柱可以自己装，装置简单，但因条件不易控制，误差较大；高压柱层析即 HPLC。由于耐高压合成凝胶的出现，HPLC 已应用于测定多糖的纯度，它具有速度快、高分辨和重现性好等优点。目前最常用的商品柱是μ-Bondagel 柱系列和 TSK 柱系列。这些柱无法自己装填。

凝胶装柱必须一次装毕，这样柱内凝胶均匀。平衡流速不应大于展层流速，内容物（载体）柱高与直径之比应在 20～30 之间。样品展层完毕后，记录洗脱体积 V_e（即记录仪上峰尖的保留时间），然后将Dextran2000 或蓝色葡聚糖及葡萄糖分别相继上样，应控制条件与样品展层一致。分别获得的洗脱体积称为空体积 V_0 和总体积 V_t。样品洗脱体积 V_e 应大于 V_0，小于 V_t。如果 $V_e \leqslant V_0$，说明凝胶选择错误，使之纯度鉴别的结果也不正确，应重新选择 Sephadex G-150 或G-200，甚至Sepharose2B 等更大的凝胶；如果 $V_e \geqslant V_t$，同样说明凝胶选择错误，应选择Sephadex G-75 或G-50，甚至更小的凝胶，重新上样测定多糖样品的纯度。

六、多糖分子量的测定

1. 测定多糖分子量的方法、原则

多糖分子量的测定是研究多糖性质的一项重要工作。多糖的性质往往与它的分子量大小有关。例如，多糖溶液的粘度不但随浓度的增大而升高，而且与多糖分子量大小有关，一般说来，分子量增大粘度增高。在生物学研究中，发现某些多糖由于分子量大小方面的差别，其所产生的某些效应有一定差异。以右旋糖酐为例，右旋糖酐（Dextran）是由细菌（Leuconostoc mesenteroides，简写为L. m.）所产生的多糖，单体分子均为葡萄糖。分子量在 10 万～20 万的右旋糖酐使红细胞聚集成缗钱状的作用极为明显，而分子量 2 万～4 万的右旋糖酐，对红细胞不但不起聚集作用，相反还会使聚集的红细胞解聚。多糖对红细胞起聚集和解聚作用，这不但存在于右旋糖酐，不同分子量大小的羟乙基淀粉、羧甲基淀粉和一些果胶等物质亦具有类似情况。

由于不同分子量大小的多糖具有不同性质，在多糖的应用中，如以其作为试剂应用于某些实验时，往往需要在它的分子量大小方面做选择。比如从血液中分离白细胞、血小板等，可使用分子量较大的右旋糖酐或羟乙基淀粉，使红细胞聚集，便于从血液中提取白细胞和血小板等成分。又如多糖在医疗应用中治疗某些血栓性疾患，如冠心病、脑血栓、血管闭塞性静脉炎等，可选用低分子量的右旋糖酐或羟乙基淀粉，因为它们具有解聚细胞的作用和直接改善毛细血管血循环的作用。可见，不论是在多糖性质的研究，还是在它的用途等方面，都涉及到分子量方面的问题，并往往需要测定它的分子量，因而测定分子量成为研究和制备多糖的一项经常性工作。

测定多糖分子量时，为了避免因存在杂质影响测定结果，需要把检测的样品（简称样品

或检样)适当提纯。用于分子量测定的样品,纯度要求虽然不十分高,但至少要满足以下几个要求:

(1)去除杂质和水分;

(2)把不同化学结构的组分相互分开,使它们在测定分子量的过程中不相互干扰。例如某些L. m. 菌株在蔗糖培养基上发酵,同时可产生两种溶解度不同的右旋糖酐,一种称为*S*-右旋糖酐,另一种为*L*-右旋糖酐,前者易溶于水,后者水溶性较差。这两种右旋糖酐的化学结构(此处指单体分子间链的配位)和分子量大小都是存在一定差异的;

(3)把不同分子量大小的组分相互分开。以美国的NRRL-L. m. -B512 菌种为例,此菌在蔗糖培养基上可同时产生两种不同分子量大小的右旋糖酐,这两种右旋糖酐的分子量相差较悬殊,组分I占发酵物的大部分,分子量可达百万,而组分II占小部分,分子量仅数万。这两组分的化学结构,基本上是一致的。

在用某些方法进行测定时,需要先将小分子量的盐和单糖除去。提纯多糖的方法:可选用合适的有机溶剂,如乙醇、甲醇、丙醇等,配成适当浓度的水溶液作为沉淀剂,反复多次将所要提纯的多糖沉淀。多糖的纯化亦可用透析法、凝胶色谱法、超速离心法等。去除多糖的水分可采用烘烤法,但烘烤温度不能过高,以防焦化,因此一般采用低温减压的方法去除残留水分。某些多糖所含的水分不易全部除去,例如右旋糖酐在减压下烘烤或在常压下(104±1)℃连续烘烤6 h,虽已可达到恒重,但用卡尔·费休水分测定法证明它仍含0.3%的残留水分,此0.3%的水分已不易去除,但对其分子量测定的影响不大。

常用于多糖分子量测定的方法有渗透压法、蒸气压渗透计法、端基法、粘度法、光散射法、凝胶色谱法和超过滤法等。由于设备和操作等原因,目前超离心法测定分子量在多糖分子量测定中应用不多。

由人为加工的高分子聚合物,一般来说分子量是不均一的。多糖的分子量分布一般比较分散,所以一般所称的分子量是分子大小的平均数,即平均分子量。一个分子量较分散的样品,若用不同性质的分子量测定法测定它的分子量,其结果往往存在一定差异。用渗透压法、蒸气压渗透计法和端基法测得的分子量是属于数均分子量($\overline{M}_n$)性质的,用光散射法测得的样品的分子量是属重均分子量($\overline{M}_w$)性质的,而用粘度法测得的分子量则称为粘均分子量($\overline{M}_v$)。下面把这三种不同性质的平均分子量的含义和计算做简单说明。

数均分子量的含义可以用下式表达:

$$\overline{M}_n = W/\sum N_j \tag{1}$$

式中W为样品重量。若将此样品按组分中的分子量大小分成若干分级,且假定i级的重量为W_i,此分级的分子量为M_i、所含的分子数目为N_i,则

$$W = \sum_i W_i \tag{2}$$

或

$$W_i = N_i M_i \tag{3}$$

$$W = \sum_i N_i M_i \tag{4}$$

将式(4)代入式(1),得

$$\overline{M}_n = \sum_i N_i M_i / \sum_i N_i \tag{5}$$

假定有一个高分子溶液，它含有100个分子量为10^3、100个分子量为10^4和100个分子量为10^5的分子，那么它的数均分子量为：

$$\overline{M}_n=\frac{100\times10^3+100\times10^4+100\times10^5}{100+100+100}=3.7\times10^4$$

从$\overline{M}_n$的计算可以看出数均分子量可视为样品组分中大小分子的算术平均数。

重均分子量的含义可以用式(6)表达：

$$\overline{M}_w=\sum_i M_iW_i/\sum_i W_i \tag{6}$$

将式(3)代入式(6)，得

$$\overline{M}_w=\sum N_iM_i^2/\sum N_iM_i \tag{7}$$

用式(7)计算上例溶液的重均分子量：

$$\overline{M}_w=\frac{100\times(10^3)^2+100\times(10^4)^2+100\times(10^5)^2}{100\times10^3+100\times10^4+100\times10^5}$$

$$=9.1\times10^4$$

粘均分子量的含义比数均和重均分子量的复杂，如式(13)所示。

粘度法测定分子量，是测定样品的特性粘度($[\eta]$)，需通过Mark-Houwink经验式

$$[\eta]=KM^\alpha \tag{8}$$

或

$$M=\sqrt[\alpha]{[\eta]/K}$$

计算样品的分子量，K和α是两个参数，其数值与样品的化学结构、所用的溶剂和实验温度等有关。

如果有一个样品，经过分级划分，其i分级的特性粘度为$[\eta]_i$，则

$$[\eta]_i=KM_i^\alpha \tag{9}$$

式(9)乘以W_i

$$[\eta]_i\cdot W_i=KM_i^\alpha\cdot W_i$$

或

$$[\eta]_i=KM_i^\alpha\cdot W_i/W_i$$

$$[\eta]=K\sum_i M_i^\alpha\cdot W_i/\sum_i W_i \tag{10}$$

将式(3)代入式(10)，得：

$$[\eta]=K\sum_i N_iM_i^{\alpha+1}/\sum_i N_iM_i \tag{11}$$

以M_v替代式(8)中的M，那么

$$[\eta]=KM_v^\alpha \tag{12}$$

式(12)等于式(11)，即：

$$KM_v^\alpha=K\sum_i N_iM_i^{\alpha+1}/\sum_i N_iM_i$$

$$M_v=(\sum_i N_iM_i^{\alpha+1}/\sum_i N_iM_i)^{1/\alpha} \tag{13}$$

式(13)中的α值与高分子的性质等有关。如果把上面所列举的高分子溶液当做右旋糖酐溶液，面右旋糖酐溶液在以水为溶剂和在25 ℃下的α值常在0.50左右，以α等于0.50计算该高分子溶液的$\overline{M}_v$，

$$\overline{M}_v=\left[\frac{100\times(10^3)^{1.5}+100\times(10^4)^{1.5}+100\times(10^5)^{1.5}}{100\times10^3+100\times10^4+100\times10^5}\right]^{1/0.5}$$

$$=8.6\times10^4$$

通过上面所举的3个计算例子，说明分别用数均法、重均法和粘均法测定同一个样品的分子量，其测定结果是有一定差别的。三种测定分子量的方法，以$\overline{M}_w$最高，$\overline{M}_v$比$\overline{M}_w$小，但二者比较接近，三者中一般以$\overline{M}_n$为最小。上例的$\overline{M}_w$与$\overline{M}_n$的比值$\overline{M}_w/\overline{M}_n=9.1\times10^4/3.7\times10^4=2.46$，比值比较大，这是由于该高分子溶液中的胶体分子的分子量比较分散。如果样品中的胶体分子大小比较均匀，则$\overline{M}_w$与$\overline{M}_n$的比值应当较小或接近于1；如果样品的分子量组分是均一的，那么二者比值应当等于1。因此，$\overline{M}_w$与$\overline{M}_n$的比值常用作检验样品的分子量分布是否均匀的一种指标。

如上所述，多糖的分子量一般是不均一的，用不同性质的测定方法，所得结果不免存在差异，因此在说明多糖的分子量时，应当把测定方法的性质说明，例如，$\overline{M}_w=45\ 000$或$\overline{M}_n=32\ 000$。

2. 渗透压法测定多糖分子量

利用膜渗透压计(membrane osmometer，简称MO仪)可以测定分子量范围在1万～50万之间的多糖的分子量。本法不需用标准品。

如果把多糖水溶液装在半透膜制成的透析袋内，袋外为溶剂(水)，那么水分子可以自由通过半透膜，多糖分子则不能通过透析膜，因此袋内的多糖分子必将吸引更多的水分子渗入袋内，从面形成一定的渗透压。渗透压可用大气压[1大气压=101 325 Pa(帕斯卡)]表示，它与溶液中的溶质分子数有关，可以用范特荷甫分式表示：

$$\pi V=nRT$$

式中π为渗透压，V为溶液体积，n为溶液克分子数，R为气体常数，T为绝对温度。

因$n=W/M$，$W=C\cdot V$(W为样品重量，M为分子量)，将其代入上式，简化后得

$$M=\frac{RT}{\left(\frac{\pi}{C}\right)_{c\to0}} \tag{1}$$

有些作者认为应当计入溶剂在不同温度时的密度D，即：

$$M=\frac{RT}{\frac{\pi}{C_{c\to0}}\cdot D} \tag{2}$$

渗透压法测定分子量，要求样品内不含分子量小至能透过半透膜的物质，否则不易达成平衡。

渗透压法成功的关键是找到合适的半透膜，要求空隙率较大而孔度均匀，并有一定强度。

MO仪测定比较费时，宜一次准备多个样品，昼夜连续进行测量，可以用一次的基线数据。

3. 蒸气压法测定多糖分子量

利用蒸气压渗透计(vapor pressure osmometer，简称VPO仪)可测定分子量范围在500～10 000之间的多糖的分子量。该方法简单、快速。

根据稀溶液的热力学性质，我们知道在溶剂中有溶质时，沸点升高、蒸汽压下降。如果将蒸汽压(P)与温度(T)作图表示，则可得图2-27。从图可以看到，在蒸气压达到平衡的一个体系中，溶液的温度要高于溶剂的温度，才能使两者的蒸气压相等。而在一定浓度时溶液比溶剂高出的温度又和溶质的分子量有关。根据拉乌尔定律，可得如下公式：

$$M=K\cdot\frac{C}{\Delta T}$$

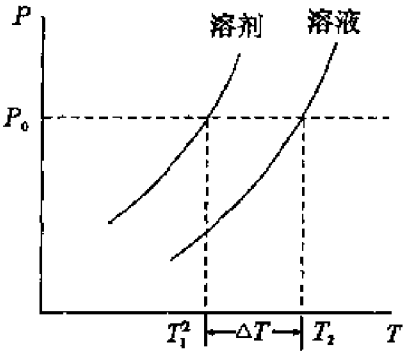


图2-27 蒸气压(P)与温度(T)的关系曲线

式中M为溶液中溶质的分子量，K为溶剂常数(可以用已知分子量的标准物测定而求得)，C为溶液浓度(mg/kg)，ΔT为溶液比溶剂提高的温度。因此用VPO仪测得ΔT后，即可计算出分子量。因本法与溶液中的粒子数有关，故得到的多分散样品的平均分子量为数均分子量。

用蒸气压法测定一定范围内的分子量，优点是快速简单，但选用标准时要注意，最好是已知分子量的同一类物质，求得稳定的K值后再进行样品的测定。

样品中不能含有NaCl、葡萄糖等小分子物质，否则所得均值偏低。

4. 端基法测定多糖分子量

用端基法测定分子量的基本原理是：测定单位重量样品中所含可测端基之数，即每克检样的可测端基的克当量数或是每毫克中的毫克当量数，从而计算检样的分子量。例如，对某一种多糖的分子结构，业已明确知道它每一个分子链含有一个可测端基和每毫克中所含的可测端基为A(mN)，那么，该多糖的分子量应该是$1/A$。由此可见，检样的分子量是它每毫克重量中所含可测端基的毫克当量数的倒数。在用端基法测定分子量时，分子量计算的通式为：检样重量mg/可测端基(mN)＝检样的分子量($\overline{M}_n$)。

所以用端基法测分子量要求检样的化学结构须具备如下两个条件：

①每一个分子链端须具有可以用化学方法做分析的基团，以便采用一定的定量分析方法对该端基做定量分析。

②检样的每一个分子链所含可测端基的数目不但须明确，而且应固定不变。

大多数多糖具有可测的还原性半缩醛端基团，对这类多糖，可采用不同的氧化法进行分析测定。在分析测定时往往需要用一个已知分子量的参比物，而且参比物的化学结构需要与样品的化学结构相仿，因为具不同化学结构的高分子物质虽具有类似的还原性基团，但其化学性质在程度上往往存在差异。例如在测定淀粉的分子量时，往往以麦芽糖作参比物，而测定右旋糖酐的分子量时，用异麦芽糖作参比物比较合适，因为前者的葡萄糖基间是以α-1→4连接的，而后者却是α-1→6连接的聚合物。

与其他的分子量测定法相比，用端基法测定多糖分子量，所需仪器设备较为简单，也不需采用多个浓度测定，再无限稀释，用做图外推法去计算样品的分子量，因而在多糖分子量测定中经常应用它。但本方法在实际应用中受到某些因素限制。除了上述的对检样化学结构方面的要求外，对分子量较大的样品应用本方法是不适宜的。因为在端基法分子量测定中，往往采用容量法或重量法，而分子量较大的多糖分子，相对地说在单位重量中所含可测

端基之数比较少，这使分析测定受到一定影响。一般认为，分子量达到2万至3万时，实验误差可能达到20%左右。再者，如果有的多糖其端基团须经过化学转化方可做测定的话，那么转化反应必须完全，且转化中不产生降聚作用，否则都将影响测定结果。下面介绍几种常用的测定多糖还原端基的定量分析方法。

(1)3,5-二硝基水杨酸比色法

本方法是利用还原糖与3,5-二硝基水杨酸反应时产生颜色来进行分析的。测定检样时，用一个已知分子量和已知浓度作参比，经过比色，计算检样的分子量。

(2)碱性铜盐试剂反应滴定法

以Somogyi氏碱性铜盐试剂氧化还原糖的方法测定多糖端基的半缩醛基团，从而计算出它的分子量。

(3)把多糖转化为氰醇(cynohydrin)的测定法

令多糖(P)与氰化钾反应，成为多糖氰醇(PCHOHCN)，然后在碱性条件下使氰醇水解，释放出氨：

$$PCHO \xrightarrow{KCN} PCHOHCN \xrightarrow{NaOH} NH_3 \uparrow$$

释放的氨用标准浓度的盐酸吸收，再用氢氧化钠滴定，释放的氨的毫摩尔量即为多糖释放的还原基团的毫摩尔量，从而计算多糖的分子量。本方法常用于纤维素等分子量测定。

5. 粘度法测定多糖分子量

粘度法测定分子量，所需设备较简单，操作较易掌握，因此常用于多糖的分子量测定。如上文所述，粘度法分子量测定，先是测定样品的特性粘度$[\eta]$，然后通过换算方程，即经验式$[\eta]=K \cdot M^{\alpha}$计算分子量。

溶液的粘度(η)一般随溶液浓度的递升而增高。溶液粘度应该比纯溶剂粘度(η_0)为高，二者的比值(η/η_0)称为相对粘度$[\eta_r]_0$。溶液的相对粘度常以溶液和溶剂在粘度计中的流出时间之比(T/T_0)表示。溶液与溶剂之间的粘度差($\eta-\eta_0$)与溶剂粘度的比值$[(\eta-\eta_0)/\eta_0$或$\eta_{r-1}]$，称为增比粘度(η_{SP})。单位浓度的增比粘度称为比浓粘度η_{SP}/C，C为溶液的浓度，其单位为g/100 mL。检样的特性粘度为检样溶液在极度稀释时的比浓粘度($\eta_{SP}/C, C\to 0$)。

推导某一种多糖的特性粘度—分子量换算方程，实际上是测求Mark-Houwink经验式中的K和α两个参数。

将该多糖按分子量大小分为若干分级，必要时将该多糖进行部分水解，将水解液分级划分，以便取得一组分子量不同的分级物。在同一条件(溶剂，实验温度等)下，分别测取它们的特性粘度$[\eta]_i$，并用光散射法(或其他方法)分别测定它们的分子量(M_i)。然后把这二组数据($[\eta]_i$和M_i)用最小二乘法或是把它们分别换算成对数后作$\lg M_i$-$\log[\eta]_i$图(以$\lg M_i$为纵坐标，$\lg[\eta]_i$为横坐标)，可得一直线，延伸后与纵轴相交交点的截距为$\lg K$，直线斜率为α。求得K和α值后，代入Mark-Houwink经验式，即为该多糖的特性粘度—分子量换算方程。

使用换算方程时务必注意下列各点：

①某多糖的换算式只适合于该多糖，如前文所述，不同种类或不同化学结构的多糖，它们间的K值和α值往往有差异，因此多糖A的换算方程不能用于多糖B的分子量换算。

②样品的特性粘度测定所采用的实验条件，务必与推导换算方程时所用条件相一致。

③多糖的分子量分布一般都较分散。同一种多糖由于分子量分布情况不同，K 值或α 值亦可能有差异，因此检样的分子量分布状况需与推导算式时所采用的相一致或相差不太多。

④分子量换算方程有其一定的换算范围，超出此范围，换算到的分子量值有一定偏差。适用的分子量限制在$\lg M_i$-$\lg[\eta]_i$ 图中的直线范围内，若样品的特性粘度超出此直线范围，则不适合做该样品的分子量换算。对某一多糖来说，它可以有多个分子量换算式，如方程A适用于分子量1万～10万的换算，而方程B用于分子量9万～20万的换算。

6. 高效液相色谱法测定多糖分子量(1)

高效液相色谱技术中，利用凝胶孔度来排阻特定大小分子的方法，被称为排阻色谱法或凝胶渗透色谱法(简称GPC)。按这种方法分离样品时，样品分子与固定相表面之间无相互作用，完全根据溶质分子能否渗透进入GPC 柱填料颗粒网孔而达到筛分大小分子的目的，因此也叫分子筛。大分子通过GPC 柱时，完全被排阻在填料网孔之外，只能在孔隙间的溶剂中流过，这时柱上洗脱的体积为V_0；小分子则可以完全自由地进出于填料颗粒网孔内的溶剂中(孔体积V_i)，它从柱上的洗脱体积$V_i=V_0+V_i$；在选择性渗透范围内的大小溶质分子，其洗脱体积V_e一般应在V_i与V_0之间。V_e、V_i、V_0三者关系如下式：

$$V_e=V_0+(K_d\cdot V_i)$$

式中K_d为分配系数，表示该溶质分子能达到的那部分网孔内的溶剂体积与填料颗粒网孔溶剂总体积之比，即

$$K_d=(V_e-V_0)/V_i$$

在GPC 中它表示溶剂的特性常数。GPC 法的示意图如下：

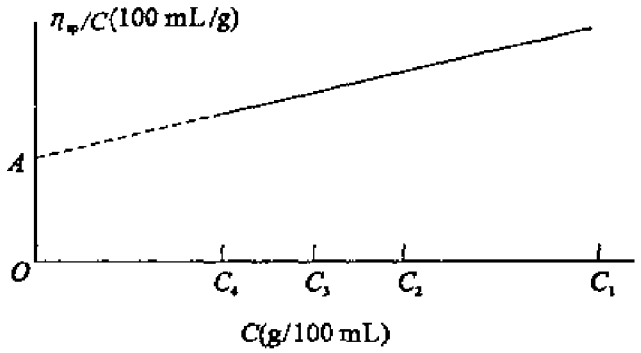


图2-28　测定特性粘度时$\eta_{sp}/C-C$图

对于完全被填料颗粒网孔排阻的大分子，因为$V_e=V_0$，则$K_d=0$；对于能自由进出网孔的小分子，因为$V_e=V_0+V_i$，则$K_d=1$。在特定的GPC 体系中，K_d还随柱的大小或形状而变，$K_d\leqq K'$，K'值总是在0～1之间(选择性渗透)。

若$K_d>1$，则肯定有另外的机制在起作用，例如溶质与填料发生吸附，或使用混合溶剂时，凝胶内的溶剂组成与流动相的溶剂组成在化学性质上有较大差异。高效凝胶填料一般由刚性和半刚性的材料制成，如果把填料放在显微镜下观察，可以看到表面具有一定网孔的大小颗粒，粒度为10 μm 或为更小的圆珠，因而有一定比表面、孔容和孔径分布。孔径可以从2

～250 nm。分子量小于1 000时月6 nm就可以，孔径为400 nm时，分子量为7×10^6也不被排阻，所以分子量的测定范围很宽。GPC填料性能有疏水性的，如交联聚苯乙烯，常用于分离分级脂溶性高分子化合物；也有亲水性的凝胶（表2-11），常用于分离水溶性高分子化合物，如蛋白质、酶和多糖等。

表2-11 GPC水溶性填料

型　　号	填料的成分
Bio-GelP	聚丙烯酰胺凝胶
Bio-GelA	琼脂糖凝胶
Porasil	去活化多乳硅胶
Bondagel	键合相硅胶，$Si(RO)nCH_3$
Lonpak	磺化聚苯乙烯-二苯乙烯凝胶
OHpak	聚乙烯醇凝胶
Sephadex	交联葡聚糖

上述凝胶填料一般都可以分离多糖，目前认为较好的是Lonpak系和TSK系的柱。Lonpak系的柱主要用于分离多糖，用水做洗脱剂。TSK系柱既可以分离蛋白质，又可以分离多糖，用缓冲液（如磷酸盐缓冲液）做洗脱剂。这两类都有商品柱（日本昭和电工生产），见表2-12和表2-13。

表2-12 Lonpak系商品柱

型　　号	排阻限	最大压力(MPa)	应　　用
Lonpak S-801	1 000	3	单糖、双糖、三糖和低糖
S-802	5 000	3	单糖、双糖、三糖和低糖
S-803	50 000	3	多糖、淀粉、纤维素
S-804	500 000	3	多糖、淀粉、纤维素
S-805	5 000 000	3	多糖、淀粉、纤维素
S-806	50 000 000	3	多糖、淀粉、纤维素

表2-13 TSK系商品柱

型　　号	排阻限		柱　　效	应　　用
	蛋白质	右旋糖酐		
TSK G2000SW	500～6万	500～2万	16 000/m	蛋白质、多肽、多糖、核糖体等
G3000SW	1 000～30万	1 000～10万	16 000/m	
G4000SW	5 000～40万	5 000～40万	16 000/m	

凝胶填料的耐高压性能带来了高流量和高速分离效果，通常在30 min内完成一次分析。这就使GPC法测定分子量具有比超速离心沉降法和经典的柱色谱法更为快速的优点，这对

水溶性高分子化合物如多糖、蛋白质和酶等分子量测定特别有利，在很短时间内不易受霉菌的污染或避免蛋白质变性和酶的失活。

在高效液相色谱的固定相中，凝胶填料相对地较软，使用时须特别注意不要超过额定压力，以免改变原来的孔度大小。为了减小压力尽量采用低粘度的溶剂，如果样品不怕热的话，也可以适当提高柱温，使粘度减小、柱压降低，以加快分离速度。

要注意样品、柱填料和溶剂之间的相容性，以免发生沉淀而把柱堵塞。为抑制细菌生长，洗脱剂中常加入0.01 %的叠氮化钠。所用的洗脱剂一定要用0.5 μm 微孔薄膜过滤，或用G-6 耐酸漏斗过滤。

按理凝胶色谱填料的表面与样品分子间无相互作用，但实际上两者不可能都是惰性的。在水做溶剂时，分子量 $10^4 \sim 10^5$ 的植物多糖在 μ-Bondagel 柱上的保留时间预计该在8～9 min，实际却在6.5 min 左右，其分子量比超离心的高一个数量级。这可能由于带酸性基团的分子不易进入预期大小的孔径内，而表现出被排阻在外的现象。用一定浓度的盐溶液做洗脱剂，此种惰况有所改善。因此，多糖的分子构型、带电荷情况等在选择色谱条件时都应加以考虑，从而调整溶液的 pH、离子强度和离子种类等，以减小离子间的静电效应，以便正确地实现排阻色谱。

7. 高效液相色谱法测定多糖分子量(2)

多糖的高效液相色谱(HPLC)多是高效体积排阻色谱(HPSEC)或称高效凝胶渗透色谱(HPGPC)。这种色谱法，样品分子与固定相凝胶之间无相互作用，完全是按分子筛原理分离。多糖所用的色谱柱不能自己装填，均为商品柱。目前常用的商品柱有μ-Bondagel 柱系和 TSK 柱系。根据分子量的大小可以选择不同的柱系，见表2-17，表2-18。为了提高分辨率，常将二根不同分离范围的色谱柱串联，如 TSK-40 与 TSK-50 柱串联，但串联时分子量范围大的柱应在前面，即进样器→TSK-50→TSK-40→检测器。流动相有水、缓冲液和含水的有机溶剂(如二甲亚砜)等，以含有一定离子强度的缓冲液为最佳。对于粘度较大的多糖(通常是分子量较大的多糖)，可适当增加缓冲液的离子强度。不管采用何种流动相，在使用前均必须过滤和脱气。如样品中含较多的盐类或蛋白质则必须首先除去，否则色谱柱极易损坏。

表2-14 μ-Bondagel 商品柱(Waters Assoc)

型　号	分离范围(分子量)
μ-PorasilGP　C6×10−3 μm	100～10 000
μ-Bondagel　E-125	2 000～50 000
μ-Bondagel　E-500	5 000～500 000
μ-Bondagel　E-1000	50 000～2 000 000
μ-Bondagel　E-Linear	2 000～2 000 000
μ-Bondagel　E-highA	15 000～7 000 000

多糖检测不采用柱前柱后衍生化方法，而是采用直接检测，最常用的为示差折射检测(RI)。RI 具中等灵敏度，其线性关系的最低敏感量为20 μg，也就是说如果进样20 μL，则样品浓度必须小于0.1%。RI 的最大敏感量为400 μg。对于酸性多糖还可用紫外检测，但多数是采用RI 与UV 同时检测。目前较先进的直接检测是小角激光散射检测，它可以直接从图

上得到每一点的绝对分子量，而不需要像RI那样预先用已知多糖制作标准曲线。

表2-15 TSK 商品柱(Bio-Rad)

型 号	分离范围(分子量)
Bio-GelTSk-30	~100 000
Bio-GelTSK-40	1 000~700 000
Bio-GelTSK-50	10 000~2 000 000
Bio-GelTSK-60	100 000~20 000 000

根据经验公式，多糖的分子量M与分配系数K_{av}、洗脱体积V_e存在如下关系：

$$K_{av}=K_1-K_2\lg M \tag{1}$$

$$K_{av}=\frac{V_e-V_0}{V_t-V_0} \tag{2}$$

其中K_1、K_2为常数；V_0为柱的空体积，即分子大到完全不能进入凝胶网孔，此时常以T-2 000或蓝色葡聚糖(M_w>2 000 000)的流出体积作为V_0；V_t为柱的总体积，即分子小至能完全进入凝胶网孔的流出体积，常以葡萄糖的流出体积作为V_t。由此可知，样品的洗脱体积V_e应在V_0与V_t之间，也就是K_{av}应在0与1之间，超过上述范围，测定结果肯定错误。如确信柱系选择无误，则可能是样品与凝胶发生吸附作用或化学反应。由各种已知分子量的标准多糖测得洗脱体积V_e，结合V_t、V_0即可计算得到每个标准品的K_{av}。K_{av}与lg M存在线性关系，在半对数坐标纸上作图即得标准曲线。再由样品的洗脱体积V_e，计算得到K_{av}。由K_{av}之值查标准曲线得lg M，就得到被测样品的分子量。当然也可不用标准曲线而用线性回归求得分子量。

由于色谱柱的固定相是凝胶，具有压缩性，使用时压力不得超过说明书上的规定值，以免改变原来凝胶的粒径。

由于多糖的柔韧可变性，导致它在不同的溶剂中伸展、皱缩的程度不一样，从而影响它在色谱柱中的迁移行为。这一点直观地反映在同一样品的V_e与K_{av}在不同流动相中有所不同，所以用不同流动相测得的分子量，允许有5%的偏差。

标准多糖与样品的结构差异以及凝胶柱对多糖可能产生的吸附作用，以及分子在柱上扩散，多糖的浓度、粘度、测度温度的微小差异，均能影响分子量的精确性，而K_{av}的引入就是为了尽可能减少各种实验条件因素产生的影响。

8. 超过滤法及其在多糖化学研究中的应用

超过滤是在常规微粒过滤基础上发展起来的细微粒子过滤新技术，是膜法分离的一种。其具体做法是：通过孔径不同的半透膜，借助于外加压力所造成的膜两侧的压力差，截留1~10 nm的粒子。这样大小的粒子可以是溶液中的大分子或胶体溶液中的胶悬体，因此超过滤又名分子过滤。由于20世纪60年代初成功地制造了高通量的超过滤膜和近十多年来新型高分子半透膜的发展，以及改进的超过滤器的不断出现，使超过滤技术迅速地发展到了实用阶段。超过滤技术具有设备简单，操作方便，不需加热或低温操作，不经任何化学物质处理，没有相的转移等优点，所以在化工、制药和食品等工业中以及在医学、生物学和环保等领域都得到了广泛的应用。

近年来在多糖化学研究中也越来越多地采用超过滤技术，这是因为在多糖化学研究中能否分离出均一的多糖是非常重要的。可是提取的粗制多糖的水溶液大多是胶体溶液，粘度大而且不稳定，其所含组分的分子量差别悬殊，不同分子量的组分之间理化性质又很相近，所以制备出均一的多糖确有不少困难。尽管采用溶剂分步沉淀法、季铵盐沉淀法、盐析法和电泳法等也可能制备出均一的多糖，但这些方法分离量甚少，有时还会引起多糖的降解；而采用超过滤技术进行多糖的分离纯化，收率高且极少破坏。现将应用超过滤技术的一般原理、超滤装置、超滤膜、操作注意事项和在多糖化学研究中的应用实例做一概要介绍，以期在多糖化学研究中能在更广的方面应用这一技术。

(1)超过滤的一般原理

超过滤原理示意见图2-29。将欲分离纯化的含有两种(或两种以上)分子量不同的溶质(溶质a和溶质b)的溶液，用变速管泵或气体压力输送到超过滤系统中。由于液体静压的作用，溶液中的溶质被压到超过滤膜的表面，这时小于膜分子量截留值的溶剂和小分子透过膜形成滤过液，即含有小分子溶质b的溶液，而大于膜分子量截留值的大分子被膜所截留。如果采用循环式超过滤系统，被截留的大分子溶质a随着加压溶液的流动被推出过滤系统形成滤不过液，即主要是含有大分子溶质a的浓缩液。这个过程反复进行多次，最终达到将溶液中分子量不同的溶质a和溶质b分离或纯化的目的。

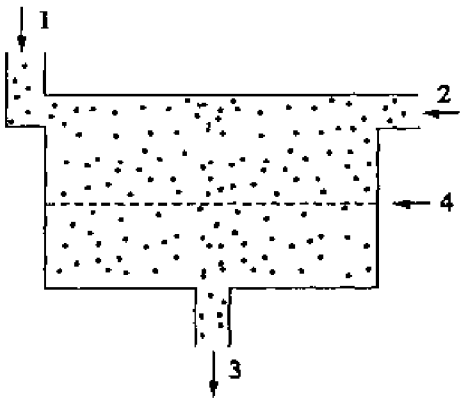


图2-29 超过滤原理示意图

1. 含有溶质a、b的受压溶液
2. 含有溶质a的浓缩液
3. 含有溶质b的滤过液 4. 超过滤膜

但在实际操作中随着过滤过程的进行，过滤速度逐渐变慢，分离效果也明显变差，其原因是被截留的大分子在膜表面沉积成一层凝胶层，即所谓"浓差极化"(concentration polarization)现象，同时沉积的大分子又向溶液中扩散，当沉积与扩散达到平衡时，恒定的过滤速度可以保持。如果在过滤速度稳定后仍继续加大压力，平衡被破坏，结果沉积速度大于扩散速度，凝胶层不断地增厚压紧，这时不仅是过滤速度减慢，而且使小于膜分子量截留值的小分子也被截留，明显地影响了分离效果。产生"浓差极化"现象的倾向大小同很多因素有关，为此人们设计了各种超过滤器以减少"浓差极化"现象的产生，其中如装有搅拌器或振动片的搅拌式或带有导流槽的缝道式超过滤器，由于增加了液体流动的剪切力，过滤时不容易产生"浓差极化"，提高了过滤效果。美国Millpore公司的Pellicon超过滤系统则采用了"切线流"(tangential flow)技术，效果也很好。该系统就是在两片超过滤膜之间加装一片聚酯纤维制成的网状截留隔板，当加压的溶液水平地流过截留隔板时，液体以曲折波动的方式迂回在网状截留隔板的上上下下，即产生所谓"切线流"。这种迅速的但又是温和的波状流提供了较高的过滤速度，而把损伤易变分子或细胞的剪切力减到最小，所以Pellicon超过滤系统可以用于干扰素、酶和病毒等的浓缩，很少或不失活，这是其突出的优点。

(2)超过滤器

为工业和实验室应用而设计的各种超过滤器的结构和特点已有详细介绍的资料，不再

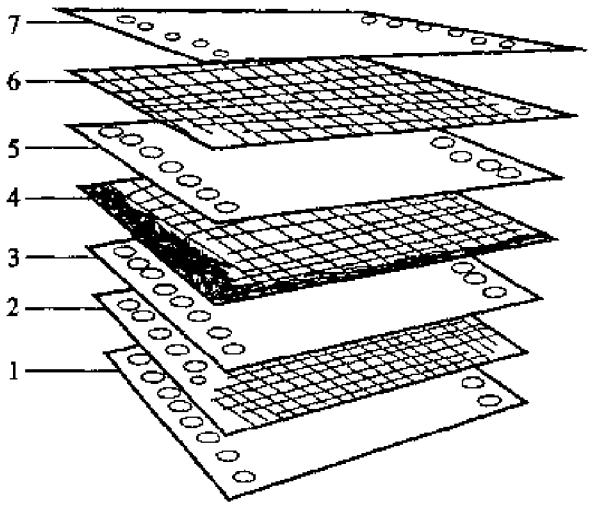


图2-30 超过滤膜的组合单元

1. 聚乙烯垫片 2. 网状分离隔板
3. 超过滤膜 4. 网状截留隔板

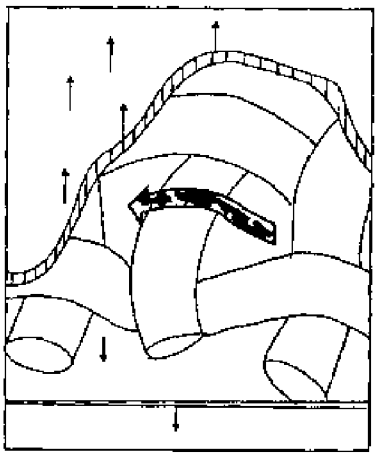


图2-31 "切线流"示意图

赘述。在此仅介绍Pellicon超过滤系统的结构特点，其设计在减少"浓差极化"和清除样品溶液中的颗粒方面有独到之处。

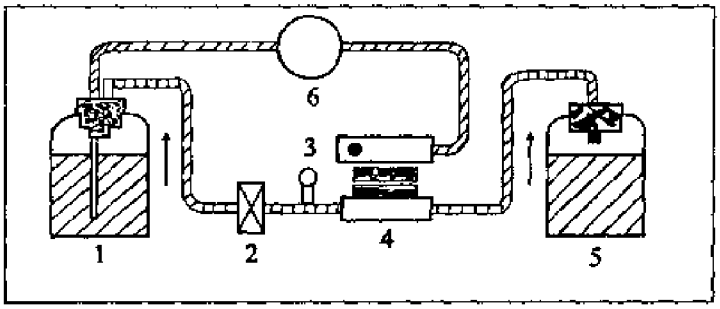


图2-32 Pellicon超过滤系统

1. 样品溶液 2. 针状阀 3. 压力表 4. 超过滤池 5. 滤过液 6. 泵

Pellicon超过滤系统的主要部件是变速管泵和超过滤池。超过滤池由两块聚甲基丙烯酸酯塑料制成的歧管板(manifold plate)中间夹超过滤膜构成。在歧管板上有两套错开的过滤通道，即五孔通道和四孔通道，当两块歧管板紧紧地夹住超过滤膜时，板上的五孔通道上的5个孔正好对准超过滤膜上用密封层围着的5个孔；板上四孔通道上的4个孔正好对准超过滤膜上未被密封层围着的4个孔。由于膜上的密封层起着控制液流方向的作用，结果五孔通道同膜的外侧相通，而四孔通道仅同膜的内侧相通。当用泵将样品溶液打入上层歧管板右侧的五孔进样通道时，溶液经膜上密封层围住的五个孔进入膜的外侧，在膜的外侧由于压力作用使小于超过滤膜分子量截留值的分子透过膜进入膜的内侧，而大于超过滤膜分子量截留值的分子被截留。这样在膜的外侧溶液被阻，并由下层歧管板左侧的五孔滤不过液通道流

出，即形成截留液。通过膜滤过的液体在膜的内侧流向下层，由歧管板右侧的四孔滤过液通道流出，形成滤过液。由于膜外侧截留液的5孔通道是斜向下流动的，结果使截留液的流动更为有力，有利于清除"浓差极化"现象。这样设计的超过滤器适合粘度较大的溶液的过滤，如蛋白质、多糖溶液等的分离纯化。

(3)超过滤膜

超过滤膜是超过滤系统的核心部分，是由高分子材料制成的，如醋酸纤维素、聚砜、聚丙烯腈、聚酰胺、聚四氟乙烯等，但应用最多的是纤维素膜和聚砜膜。由于工艺不断改进，现在已能工业生产各种大小规格和各种不同分子量截留值的超过滤膜。超过滤膜的规格是以分子量截留值为标准的，也就是说溶液中溶质分子量超过膜分子量截留值时，这种溶质的大部分能被截留。当然分子量截留值实际上是近似值或统计平均值，因为球形分子就比相同分子量的线形分子易过滤，低分支的分子就比相同分子量的高分支的分子易过滤。

超过滤膜的结构大致有不对称膜、对称膜和介于二者之间的膜，过滤效果比较好的是具有双层结构的不对称膜。所谓不对称膜是指膜的正反两面的结构不同，表面是紧密光亮而又很薄(0.1～10 μm)的表皮层，这层是超过滤膜主要起截留作用的部分，在表皮层下面是多孔的支撑层(100～200 μm)，主要起支撑作用。Pellicon超过滤膜就是由纤维素或聚砜制成的不对称膜，是以标准分子量极限(nomimal molecular weight limts，缩写成NMWL)作为膜截留的标准的。由醋酸纤维素制造的PS系列膜的特点是通量大但很脆、易碎；由聚砜制造的PT系列膜的特点是耐热、耐酸碱、不易碎，但通量比PS系列小。Pellicon超过滤膜有数层膜粘合在一起的组合(cassette)膜(过滤面积0.46 m^2)和单张的片膜(过滤面积0.023 m^2)，可根据溶液量的多少分别选用。

(4)超过滤在多糖化学研究中的应用实例

①多糖的分子量分级：一般提取的多糖大多数都是高分散性的，分子量分布范围较宽，不适宜进行化学分析，因此首先要采用各种方法以减少分散度，使分子量在较窄的范围内分布，也就是制备均一的多糖。多糖纯化的方法尽管很多，但均较麻烦，有时会引起多糖的降解，而当应用具有不同分子量截留值的超过滤膜进行超过滤时，则可快速简便地将高分散的多糖分成几个分子量不同的组分，达到分子量分级的目的。

应用Millipore公司生产的Pellicon超过滤系统及组合膜PTHK 00 005(NMWL 100 000)、PTGC 00 005(MNWL 10 000)两种膜超滤和用透析袋透析进行柴胡多糖的分子量分级。

将柴胡粗多糖溶于水，用变速管泵以0.1 MPa的压力把样品溶液打入孔径为1 μm的Fluorogard滤棒(Millipore公司)，进行分级前的预过滤，滤除多糖溶液中可能存在的大颗粒，然后将澄清的溶液用管泵打入Pellicon超过滤系统。首先以0.1 MPa的压力通过PTHK00 005超过滤膜，得滤不过部分(I)和滤过部分，再以3 kg/cm^2的压力通过PTGC00 005超过滤膜，得滤不过部分(II)。滤过部分通过透析袋室温透析，得透不出的袋内部分(III)和透出的袋外部分(IV)。这4个部分通过超速离心法测其分子量与估计分子量基本相符(表2-16)。

表2-16　超过滤分级柴胡多糖各部分的分子量

分级部分	估计分子量*	超离心法测得分子量
I	10万以上	100 955
II	1万～10万	28 782
III	5 000～1万	8 099
IV	5 000以下	1 112

* 根据超过滤膜的NMWL值和透析袋，一般认为可透过分子量大约5 000左右的多糖。

其中部分III通过葡聚糖凝胶G75柱层析、扩孔硅胶柱层析、示差折光检测和超速离心均显示一个单峰，表明III是均一成分。然而部分IV用同样方法检测则有几个峰，证明IV是不均一的。

②多糖的脱盐：从植物中提取的多糖都含有相当数量的无机盐和小分子糖类，尤其是分子量小于5 000的小分子多糖所含无机盐更多。因为分子小故不能用透析方法除盐，用其他方法虽能脱盐但方法烦琐，而用分子量截留值小的超过滤膜进行超滤，无机盐及小分子量的糖均被滤掉，就很方便。

应用Millipore公司生产的片膜PSAC OHV-10(NMWL1 000)对柴胡小分子多糖进行脱盐处理：

柴胡小分子多糖(IV)含有较多的小分子糖类和无机盐，按药典法测其灰分值可达47%，用蒸气压法测其分子量为1 095。把IV溶于水，其水溶液以0.35～0.4 MPa的压力打入PSAC OHV-10超过滤膜进行超滤，滤不过部分用水稀释后再过滤，反复4～5次，最后滤不过部分用乙醇沉淀后得部分(V)。干燥的多糖(V)再测灰分值仅有8%，测分子量为3 400。这结果说明通过分子量截留值小的超过滤膜进行小分子量多糖的超过滤，不仅无机盐被大量除去，而且小分子糖也被滤除，使分子量分布更集中，多糖被进一步纯化。

③多糖溶液的浓缩：多糖提取液一般都是浓度稀、体积大，因此在多糖分离前首先要进行浓缩，但通常的浓缩方法都是在加热的情况下进行的，而应用超过滤法则完全可以在室温下快速大量的浓缩多糖溶液。

应用Amicon公司的Amicon thin-chammel超过滤系统(TCF-10)和UM-10超过滤膜(具有亲水性，中等流速，分子量截留值10 000)进行玉米粉水解得到的玉米浆的浓缩：

玉米浆的主要组成是葡聚糖，但浓度只0.47%，而且还有相当数量的小分子糖类。为了浓缩纯化，在UM-10膜上以2.76×10^5 Pa的压力，平均流速90 mL/h进行超过滤，得滞留液54 ml和滤过液768 ml，滞留液体积大为减少。然后通过Bio-Gel P-2凝胶柱层析测定滞留液和滤过液的糖含量，用5 mol/L的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)(含有0.01%的叠氮化钠)洗脱，流速30 ml/h，10 ml一部分进行分步收集。用酚-硫酸法测糖含量，以糖含量与洗脱体积作图得到洗脱曲线。同玉米浆的洗脱曲线比较，表明滞留液中低分子量糖比玉米浆原液减少了，而滤过液中的低分子量糖比玉米浆原液明显地增加了。如此，通过降低低分子量糖的比例达到浓缩和纯化的目的。

④多糖分子量的测定：超过滤法测多糖的分子量是应用适宜的分子量截留值的超过滤

膜，以各种已知分子量不同的多糖作标准进行超滤，测百分滤过量，然后以百分滤过量对分子量作图得出标准曲线。在相同超过滤膜和相同测定条件下测定样品的百分滤过量，从标准曲线上即可求出近似的分子量。

应用Amicon公司生产的Amicon超过滤器(Model MMC，8chambers)和超过滤膜PM-10(分子量截留值10 000)、XM-50(分子量截留值50 000)、XM-110A(分子量截留值100 000)测定香菇菌丝多糖的近似分子量：

从人工培养的香菇菌丝提取的多糖是甘露聚糖。粗制多糖经Ectcola-纤维柱层析和Sephadex柱层析得纯化的精制多糖KS-2，它具有明显的干扰素诱导作用和抗肉瘤-180作用。为测定KS-2的分子量，首先将已知分子量的各种多糖溶于水或0.15 mol/L的NaCl(溶于0.01 mol/L，pH 7.2的磷酸盐缓冲液中)，制成浓度为100 μg/ml或200 μg/ml的多糖液。各取5 ml置于Amicon超过滤器中超滤，收集2.5 ml，取0.5 ml测糖含量，比较滤前及滤后的糖含量，算出百分滤过量(三次平均值)，以百分滤过量对分子量作图得出三种膜的三条标准曲线(图2-33)。再用KS-2在三种膜上和相同测定条件下进行超滤，结果PM-10、XM-50膜基本上完全截留KS-2，而XM-110A膜适合于KS-2分子量测定。从XM-110A膜上测得KS-2的百分滤过量，然后再从XM-110A的标准曲线上得出KS-2的近似分子量约为6×10^4～9.5×10^4。

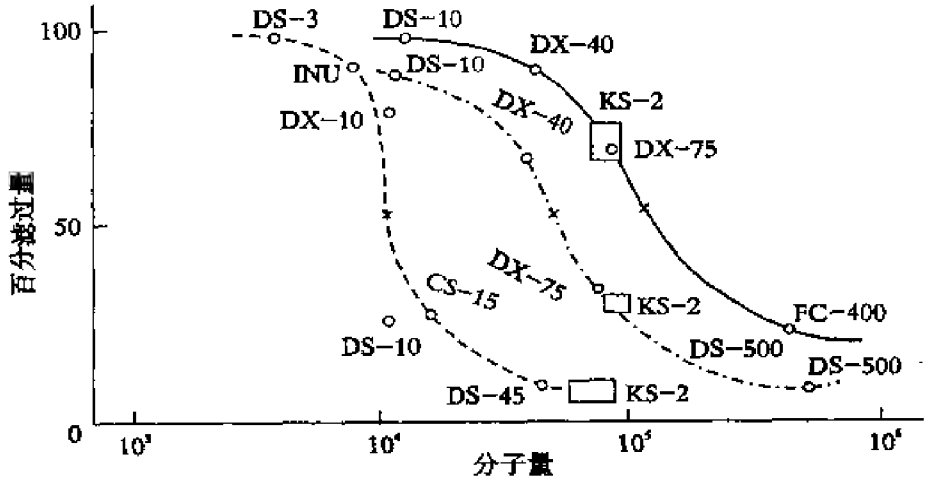


图2-33 超过滤测KS-2的分子量

----在PM-10上的标准曲线

-·-·-在XM-50以上的标准曲线

——在XM-110A上的标准曲线

×表示50%滤过量

□表示KS-2的百分滤过量

超过滤是一种效率很高的分离技术，设备简单，操作易掌握，惟制备孔径均匀的超过滤膜要求较高的技术条件，而要铺制符合要求的而积大的膜更不容易。国外已有几家公司生产各种规格的超过滤膜商品，国内仅有试制产品还没有工业产品出售。国内有些单位用研制的或自己手工铺制的超过滤膜分离纯化mRNA、蛋白质和酶。根据不同的需要在多糖化学研究

中试用手工制膜也是可能的。尽管超过滤技术用于多糖分离、纯化和鉴定的文献资料尚少，但由于超过滤技术具备独特的优点，今后这一技术必将在多糖的化学研究中得到更为广泛的应用。

第五节　多糖的抗肿瘤活性及药用功能

一、植物和微生物多糖

此类多糖——尤其是其中的真菌类多糖多属于扶正固本型免疫激活剂，是颇具前途的癌症辅助治疗药物，并有以下特点：(1)对移植性肿瘤，特别是某些纯系小鼠迟缓型瘤谱，抑制作用较强；对去胸腺小鼠的移植肿瘤无抑制作用，说明其抑瘤机理主要作用于免疫系统。(2)一般是通过免疫关系保持稳定而发挥效应的。对巨噬细胞有激活作用时，淋巴细胞的活性就相对减弱；淋巴细胞活跃时，巨噬细胞的活性相对降低；体液免疫反应增强时，细胞免疫反应减弱，反之亦然。(3)有较好的抗放、化疗副作用的功能，能增强或不降低放、化疗的效果。(4)无毒、副作用，使用安全。(5)改善癌症患者的临床症状，提高生存质量，延长生存期，与手术，放、化疗并用，效果更好。

1. 茯苓多糖(Pachymaran)及其衍生物

茯苓多糖是由茯苓(*Poria cocos*)中提得原茯苓多糖(pachyman)经氧化、还原、水解等步骤切断其$\beta(1\rightarrow6)$支链后所得的产物。有实验表明，茯苓多糖对ICR/JCL小鼠的抑瘤率达90%以上，能增强巨噬细胞和T淋巴细胞的细胞毒性作用；其对抗癌γ射线所引起的小鼠末梢血液白细胞有抑制作用，使小鼠的脾脏、胸腺和再生产肝明显增重。茯苓多糖可增强机体免疫功能、激活免疫监视系统，巨噬细胞的吞噬功能是通过激活补体间接加强的；也有人认为它对癌细胞的抑制作用是通过抑制DNA合成而实现的，是直接细胞毒性作用。对去胸腺小鼠几乎无抑瘤作用。以该多糖配合放、化疗治疗鼻咽癌、胃癌均取得协同效果。该多糖对慢性肝炎病人的免疫功能起调节的作用，使其肝功能得到改善，部分病人肝功恢复正常。

2. 云芝多糖(PSK)

由云芝(*Coriolus versicclor*)中提得的蛋白多糖。有实验表明，腹腔注射对ICR/JCL小鼠S-180的抑瘤率为97.6%，口服的抑瘤率为66.0%；对AH-13、AH-14、AH-66、L-1210等也有效果。同时，它能增强荷瘤动物的免疫功能，阻止动物由于荷瘤或使用化疗而引起T细胞和B细胞免疫功能下降。可使荷瘤小鼠胸腺萎缩恢复正常，并使淋巴细胞组成变化恢复正常。可改善荷瘤小鼠因使用化疗而降低的抗感染能力，防止白细胞下降。

可单独使用，也可和放、化疗并用。用于治疗消化道癌、颈部癌、乳癌、肺癌和恶性淋巴肿瘤的效果为：单独给药是62/293(21.2%)，合并给药是73/210(34.8%)。

3. 香菇多糖(Lentinxn)

从香菇(*Lcntinus edodess*)中提得。有实验表明，它对小鼠S-180的抑瘤率达73%以上，与化疗配合使用可增强抗癌作用，能抑制3-甲蒽醌的致癌作用。它是T细胞特异性的免疫佐剂，促进胸腺细胞向T细胞分化，对乳腺癌有治疗作用。它与丝裂霉素、环磷酰胺、阿糖胞苷、

5-氟尿嘧啶合用，有协同作用。

4. 酵母多糖

由食用原酵母(*Candida utilis*)中提得。对S-37、S-180、吉田肉瘤和艾氏腹水癌均有明显抑制作用；当酵母多糖与瘤细胞混合接种时，效果更显著，抑制率为95%～100%，肿瘤消失率达80%。增强网状内皮系统的吞噬功能。其抗肿瘤作用途径主要在于识别和处理抗原阶段，使致敏淋巴细胞对肿瘤细胞发生特异性免疫反应。可提高化疗或术后化疗效果，减少肿瘤转移。

5. 猪苓多糖

由猪苓(*Polyporus umbellatus*)提得。有实验表明，它对小鼠S-180有显著抑制作用，瘤体积抑制率为50%～70%，瘤重抑制率30%以上，约有6%～7%荷瘤小鼠的肿瘤完全消退；消退1个月至半年后再接种瘤细胞，观察1个月，均不再生长肿瘤，对照组100%长出肿瘤。同时，它还具有刺激网状内皮系统的吞噬功能，促进抗体生成；升高荷瘤动物癌细胞的CAMP含量，抑制癌细胞DNA的合成，使癌细胞逆转。它配合放、化疗治疗各种癌症300例及治疗慢性肝炎170例，可提高癌症及肝炎患者的免疫力，减轻放、化疗的副反应，改善临床症状。

6. 银耳多糖

由银耳(*Tremella fuciformis*)中提得。有实验表明，银耳多糖对小鼠S-180的抑制率为35.4%，能减轻钴γ射线及环磷酰胺对小鼠和狗的放、化疗反应，促进受损造血系统的恢复。它还有抗溃疡和抗炎作用。增强免疫系统的功能；促进肝脏蛋白质的合成，主要作用环节是促进转录过程，增加RNA的合成。银耳多糖对白细胞减少及免疫功能低下的患者有明显的升白及增强细胞免疫功能的作用。

7. 灵芝多糖

由灵芝(*Ganoderma lucidum*)的子实体中提得。它具有增强小鼠腹腔巨细胞的吞噬功能，促进蛋白质合成，改善造血机能，诱导细胞色素P-450等作用。增强机体的防御功能，提高机体保持稳态的能力。

8. 沙门氏菌脂多糖(KCG)

有实验表明，它对艾氏腹水癌有抑制作用，可使实验肿瘤出血、坏死，提高单核细胞的吞噬功能，抑制瘤细胞的有丝分裂并有细胞毒性作用。它能使消化道癌、肝癌、胰腺癌患者的肿瘤缩小。

9. 溶血性链球菌多糖(OK-423)

有报道，它对小鼠艾氏腹水癌及实体癌均有抑制作用，能增强化疗对艾氏癌、S-180及AH-66的疗效。体外实验对吉田肉瘤及腹水癌细胞有杀伤作用，可提高机体非特异性免疫功能。与5-氟尿嘧啶合用，可增强对肺癌及胃癌的疗效。

10. 变形杆菌脂多糖

采用皮下注射对艾氏癌抑制率达85.4%，静脉和腹腔注射效果较差。可提高单核细胞的吞噬功能，增强其对瘤细胞的识别能力并有直接杀伤作用。

11. 百日咳杆菌脂多糖

它能增强致敏淋巴细胞的敏感性，促进淋巴细胞向T细胞分化。

12. 箬竹多糖

从箬竹(*Sassa senanensis*)的叶中得到。它对小鼠艾氏腹水癌及S-180的消瘤率为79%～90%，对肝腹水癌AH39有100%的抑制作用。体外对癌细胞有选择性破坏作用。对正常细胞完全无损，可提高正常和带癌动物的血浆蛋白尤其是球蛋白的含量，对50例各种癌症的治疗均取得较好的效果。

13. 人参多糖

从人参(*Panax ginseng*)中提得。它对小鼠S-180、艾氏腹水癌的瘤重有40%～60%抑制率。增强小鼠网状内皮系统的吞噬功能和抗体的生成，对溶血素的产生有刺激作用。

14. 黄芪多糖

从黄芪(*Astragalus mongholicus*)中提得。有报道，它能增加小鼠腹腔的巨噬细胞数，显著提高其吞噬能力；使脾脏增大，RNA含量增加，氚-UR掺入RNA的量降低。能拮抗PHA、CCl_4及强的松龙的毒性作用，增强RNase抑制因子抑制RNase的活力。使RNA的分解代谢降低，引起RNA累积和合成速度降低。

15. 刺五加多糖

从刺五加(*Eleutherococcus senticosus*)提得。有实验表明，它对小鼠S-37、S-180、肝癌有显著抑制作用。用药后荷瘤小鼠在肿瘤生长被抑制的同时脾重增加，可减少环磷酰胺引起的白细胞数下降及脾脏萎缩。显著增强免疫功能，促进脾细胞产生特异性抗体和刺激腹腔巨噬细胞的吞噬功能，从而产生抑瘤、抑菌和解毒作用。

16. 红花多糖

从红花(*Carthamus tinclorius*)提得。它能增加脾细胞对SRBC空斑形成的细胞数，拮抗强的松龙的免疫抑制作用，是免疫调节剂。

17. 黑木耳多糖

从黑木耳(*Auricularia auricula*)提得。可增加吞噬细胞的吞噬功能，抗放和升高白细胞的生物活性。明显抑制大鼠应激型胃溃疡的形成，能促进醋酸型胃溃疡的愈合。有明显抗炎作用。抗溃疡作用可能与抗炎作用有关。

18. 薜荔多糖

从薜荔果(*Fucu pumila*)的种子中提得。它对多种大、小鼠实体瘤、腹水瘤均有明显抑制作用，特别对淋巴肉瘤1号、瓦克瘤-256、网状细胞肉瘤、S-180的抑制作用更为显著。

19. 其他

蜈蚣掌多糖，从蜈蚣掌中提得，对小鼠S-180有明显活性，未发现毒性。麦草半纤维素B对小鼠肉瘤180的抑瘤率可达99.5%，瘤体消退数为8/10；对艾氏癌也有作用。

从稻秆、玉米秆、甘蔗渣及糖蜜中提得的多糖均有抗癌作用，其中稻秆、甘蔗渣及糖蜜的多糖对S-180的抑制率分别为97%、92%及94%。甘蔗渣多糖对艾氏腹水癌的抑制率为99%，糖蜜多糖对艾氏实体癌的抑制率为100%。

地衣多糖有抗癌作用，从石耳(*Gurophora esculenta*)提得的GE_3，从东方肺衣(*Lobcria orientalis*)提得的LOF-1、LOF-2，从栎扁枝衣(*Eveernia prurastri*)提得的EP-7，从冰岛地衣(*Cetraria ialandica*)提得的地衣聚糖(lichnan)和异地衣聚糖等对S-180均有显著抑制作用，抑制率达70%～90%。

二、动物多糖

动物多糖主要是粘多糖。粘多糖是动物体内蛋白聚糖分子中的糖链部分。在蛋白聚糖分子中，许多糖链通过共价键与核心蛋白相连。粘多糖存在于动物外膜及细胞间质中。各种腺体分泌出来的起润滑作用的粘液中富含粘多糖。粘多糖在结缔组织中的含量也很高，是结缔组织无定形基质的重要成分。粘多糖在维持组织及机体的整体结构、保持细胞外液的稳定方面，在组织成长和再生过程中，在受精过程中以及机体与许多传染原（细菌、病毒）的相互作用中均起着重要作用。

外源性粘多糖的生物学功能成为粘多糖药用的基础。

1. 肝素

因首先从肝脏中分离出来而得名，实际上肺脏比肝脏含量更高，从一些植物例如豌豆、蚕豆中也能得到。肝素通过特异性相互作用，活化血浆中的抗凝血酶Ⅱ而中和参与凝血酶生成的X_a，并灭活凝血酶及XII_a、XI_a、IX_a等凝血因子，所以在预防和治疗血栓栓塞性疾病（肺栓塞、弥漫性血管内凝血、心肌梗塞、脑栓塞）方面被认为是很有效的药物。肝素能引起毛细管内皮、脂肪组织及肝脏释放脂蛋白酯酶（催化三酸甘油酯及乳糜微粒的水解），因而可用作预防动脉粥样硬化的血浆脂质消除剂。肝素能引起一系列独特的生物效应，例如对抗一系列毒素及阻断抗原—抗体反应对机体起保护作用，这已成为治疗烧伤、肾小球、肾炎的依据。肝素还可用于预防或治疗腹腔和胸腔内脏器粘连。肝素口服无效。

2. 硫酸软骨素

硫酸软骨素长期以来用于由链霉素所引起的听觉障碍的预防和治疗，有清除主动脉和组织培养细胞中的脂质和脂蛋白的作用。对猴、大鼠、兔等动物病理模型具有抗动脉粥样硬化及抗致粥样斑块形成以及降低血清胆固醇的作用。对兔、狗及人个体有抗血栓形成或抗凝作用，能加速大鼠实验性冠状动脉硬化或栓塞引起的心肌坏死和变性的愈合、再生和修复，能使大鼠粥样硬化的冠状动脉分支或侧支循环增加。硫酸软骨素A（CSA）已作为医药产品用于临床。CSA对冠状动脉供血不足的心电图有明显的改善，对心绞痛、心肌缺血等症状有显著疗效，无毒性，副作用较小。

3. 透明质酸

主要功能是在组织中吸着水分，具有保护和粘合细胞使其不至分散的作用。透明质酸作为人工玻璃体已于近年用于眼科临床。体外组织培养发现有抗病毒作用。在具有强烈传染性的细菌中、在迅速生长的恶性肿瘤中以及在蜂毒和蛇毒中，均含有透明质酸酶，它能引起透明质酸的分解。搞清透明质酸和透明质酸酶在病理过程中的作用，在临床上是很有价值的。

4. 甲壳多糖

甲壳多糖（即甲壳质）是药物的良好载体，具有缓释、长效的特点，可作为药物缓释剂，有做成膜状的及压成片状的。它有降低胆固醇、血脂等的作用，已有报道将其用作心血管系统降低胆固醇的药物。甲壳多糖因化学惰性，不与体液作用，对组织无异物反应，无毒以及具有抗血栓、耐高温消毒等特点，所以是优良的医用高分子材料，可用于制作人造皮肤、人造血管、人工肾等，还可制成外科手术缝合线。甲壳多糖还有促进伤口愈合的作用。甲壳多糖对

多种细菌和寄生虫有抑制作用，将它粉碎成微型粉末，配入生理盐水，注射入体内，能进行抗原抗体反应，同病原体作用，增强抗体和免疫能力。甲壳聚糖是碱性多糖，有止酸、消炎等作用，可抑制胃溃疡；还有凝集白细胞的能力而对正常的骨髓细胞无影响；壳聚糖还在降低胃酸、促进伤口愈合、消除脚癣等方面有明显药效。甲壳质的低聚糖具有强烈的生理活性，在抗癌新药和营养保健品方面具有较大发展前景，可作为早期癌症的治疗药物。另外，壳聚糖作为神经组织修复导管的新技术，有望克服移植法的弊端。当神经纤维长到所需长度并开始执行正常功能时，管材将开始自行降解。改性甲壳素纤维（如增强聚乳酸复合材料）用做骨折内固定装置有望解决聚乳酸类骨折内固定装置降解过快的问题。值得提出的是甲壳质的小分子在调控生理和病理过程中已显出相当活性，对它们的研究与开发已提到重要地位。

5. 刺参多糖

将鲜刺参（*Stichopus iaponicus*）的体壁经胃蛋白酶及胰匀浆水解去蛋白，后用丙醇沉淀得粗多糖，再用氧化法脱色，以二乙氨基乙基纤维素分离精制，获得单一的粘多糖硫酸脂。腹腔注射50 mg/kg，对小鼠S-180的抑制率为53%，对S-37的抑制率为49%，对淋巴肉瘤的抑制率为51%，对黑色素瘤的抑制率为55%，对小鼠乳腺癌MA-737的抑制率为79.3%。具有抗小鼠乳腺癌MA-737肺转移的作用，并能促进巨噬细胞的吞噬功能。从刺参内脏鲜组织中得到的两种酸性多糖（SJVS及SJVP）也具有抗肿瘤活性和抗凝作用。利用有抗凝作用的粘多糖防止肿瘤转移及提高化疗药物作用的同时，降低其毒副作用，有可能为抗癌治疗提供新途径。

6. 玉足海参多糖

从干燥玉足海参（*Holofhuria leuospilota*）体壁中提得两种酸性多糖HL-P和HL-S。HL-P对牛凝血酶有较强的抑制作用（体外），能抑制多种小鼠移植瘤的生长。另一玉足海参粘多糖HLMP能增加小鼠脾重，促进机体对血中炭粒的吞噬速度，提高腹腔巨噬细胞的吞噬能力，明显提高机体单核巨噬细胞系统的吞噬功能。

7. 鹿茸多糖

从制备鹿茸精的废渣中提得。对醋酸型、应激型及幽门结扎型胃溃疡均有明显抗溃疡作用，对消炎痛型溃疡无效。对五肽胃泌素引起的胃酸增多有明显抑制作用，对组织胺和毛果芸香碱所致胃酸增多无影响，也不影响这两种药物处理的大鼠胃液中PGE_2的含量。对预先用阿斯匹林处理的大鼠，灌服鹿茸多糖，不影响胃液分泌量、胃液总酸量和胃液中PGE_2的含量。推测鹿茸多糖的抑制胃分泌和抗溃疡作用可能与其对PG代谢的影响有关。

综上所述，多糖有多方面的药用功能，且毒副作用很小，已在天然药物的研究中形成了具有广阔前景的新领域。鉴于激活免疫功能是与我国传统医学的扶正固本理论相符的，进一步发掘已知多糖的新用途（例如抗衰老等功能）乃是很有现实意义的。

主要参考文献

1 Trudy Mckee, JamesR. Mckee. 生物化学导论. 北京：科学出版社，2001

2 周润琦，陈石根，李致勋. 生物化学基础. 北京：化学工业出版社，1994

3 沈同，王镜岩，赵邦铧. 生物化学. 北京：人民教育出版社，1981

4 李建武. 生物化学. 北京：北京大学出版社，1990

5 罗纪盛，张丽萍，杨建雄．生物化学简明教程．北京：高等教育出版社，2001
6 吴东儒等．糖类的生物化学．北京：高等教育出版社，1987
7 Muzzareu. R. A. A，chitin. Oxford、Pergamon Press. 1997
8 甘纯机．褐藻胶的生产及应用．北京：农业出版社，1989
9 蒋挺大．甲壳素．北京：中国环境科学出版社，1996
10 蒋挺大．壳聚糖．北京：化学工业出版社，2001
11 张惟杰．糖复合物生化研究技术．浙江：浙江大学出版社，1994
12 王友同、吴文俊．生化制品的技术开拓．北京：中国食品出版社，1987
13 袁静明．凝胶层析法及其应用．北京：科学出版社，1975

第三章　蛋白质化学

【本章要点】

一　蛋白质的功能、分类及蛋白质工程
二　氨基酸的功能、结构、性质
三　蛋白质的性质
四　蛋白质的结构分析
五　其他若干问题

第一节　蛋白质的功能、分类及蛋白质工程

一、蛋白质的功能

对生物体来说，比起多糖这类生物大分子，蛋白质、酶和核酸这几类生物大分子显得更重要，它们是和生命直接相关的各类物质。生命最基本的特征是能够进行新陈代谢和自我复制。生物体从环境中得到物质和能量，用以自身的繁殖并能发生传给后代的永久变化，就这一生命的重要过程来说，DNA 当然是第一位的，它是基因的载体，但蛋白质也是极为重要的，没有蛋白质的作用，DNA 的复制、信息的转录、遗传密码的翻译等均无从谈起。

一个生物体从出生、繁殖下一代到生命结束，无时无刻不在进行着各种化学和物理变化。从现有知识看，地球上所有生物体的全部活动都是由各种不同的蛋白质来承担的。蛋白质可简称为功能大分子，核酸是遗传大分子。蛋白质在生物体内的功能简述如下。

(1)催化功能：从食物入口开始，接着将食物消化，吸收其中有用的物质，将之转化成各种生物体内所需的物质，而将一些剩余的废物排出体外。这过程有一系列的化学反应，与无机界不同，生物体的所有这些变化都是在酶的催化下进行的。酶主要是一大类特定的蛋白质分子，它们非常高效而专一地催化体内各种化学反应。

(2)运输功能：生物需要呼吸，高等动物吸进O_2呼出CO_2。血液中的蛋白质——血红蛋白从肺部携带O_2，将之传送到全身，然后将部分CO_2带到肺部吐出到体外，这就是蛋白质的运输功能。另外，体内许多小分子物质和离子进出细胞也是由某些特异蛋白质承担运输任务的，即许多蛋白质起搬运某些物质的功能。

(3)运动功能：生物体要运动，小的微生物体内有几种管运动的蛋白质，这些蛋白质分子的相互滑动引起细胞形状的改变，使细胞前后爬动。高等动物也有类似的几种运动蛋白质，

它们要比微生物的复杂，蛋白质分子间的装配也巧妙得多。高等生物的自主运动如四肢的活动和非自主运动如心脏的跳动等都是由肌肉来承担的，而肌肉都是由各种可运动的蛋白质和可调节控制的蛋白质组成的，肌肉收缩是通过肌球蛋白质和肌动蛋白质的相对滑动来实现的。

(4)调节功能：生物体内各种反应的快慢，各种产物的多少，某些刺激引起的兴奋或抑制，体温的高与低等等，这些变化都只允许在一定范围内波动。控制这种波动范围需要有一系列的调节控制系统。激素系统是其中最重要的，有许多蛋白质及多肽是激素系统的重要成员。

(5)防御功能：此外还有专管感觉接受的蛋白质，起各种防御功能的蛋白质。生物体有一整套的防御体系，用以防御致病微生物或病毒侵害而产生的抗体。抗体是一类高度专一性的蛋白质，它能专一识别病毒、细菌以及机体细胞，并与之相结合，起着保护机体的作用。此外，还发现某些蛋白质以干扰素形式存在于细胞内，消灭在抗体蛋白质作用下"漏网"的入侵病毒。

(6)识别功能：近代分子生物学的研究还表明，蛋白质在遗传信息的控制、细胞膜的选择通透性以及高等动物的记忆、识别机制方面也起着重要作用。

(7)结构成分：蛋白质更是生物体的细胞和组织的主要组成成分，也是生物体形态结构的物质基础。

二、蛋白质研究概况及蛋白质工程

在蛋白质这个领域有两件事我们应该记住：

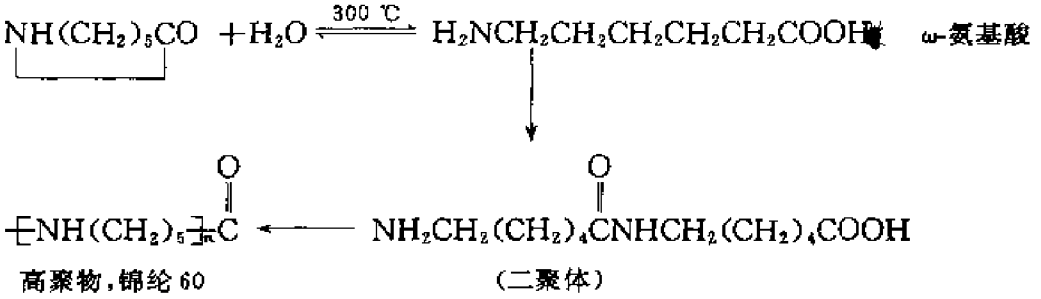
(1)1931 年，我国学者吴宪(福建人)提出的蛋白质变性学说至今被公认。其大意为：天然蛋白质具有规则紧密的结构，这种规则的结构由副键联系稳定，变性因素破坏了这种副键，蛋白质结构便会松散，有规则的蛋白质结构就会变为无规则松散的结构。1993 年为纪念吴宪先生诞辰100 周年，中国生化学会在沈阳召开了第八届全国生化学术会议，并专程从美国邀请吴宪先生的公子吴瑞到会作报告。

(2)1965 年，我国生化学家首先人工合成了具有活性的蛋白质——牛胰岛素(这是一个56 个氨基酸残基组成的小蛋白，主要用于治疗糖尿病)，处于国际领先地位。该课题的主要负责人为当时任上海生化所所长的王应睐教授，福建金门人。这项工作后来获国家自然科学一等奖，但王应睐教授谦让，在获奖者名单上都没有他的名字，表现了他崇高的品质。

20 世纪 60 年代后期起，核酸的研究开始取得突破，生化学家和分子生物学家将他们的兴奋点转向了核酸，并获得了重大进展，硕果累累。但是到了80 年代，核酸学家注意到，他们的工作要进一步深入发展，蛋白质的一系列问题必须高度重视。对核酸知识的发展极大地丰富了研究蛋白质的思路、途径和手段，也促进了蛋白质的研究。究其实是蛋白质由于功能的多样性，它的性质也是多种多样的。既存在着大量性质一般的蛋白质，但也常会遇到性质古怪的蛋白质，因此，目前丰富多彩的蛋白质不仅是蛋白质化学家专有的研究对象，而且也成了从分子水平上研究各种生物学现象的科学家的研究对象。蛋白质正在成为新的水平上普遍受到重视的宠儿，变成了最热的研究领域之一。

蛋白质研究变热，还有一个值得一提的重要原因就是蛋白质的研究有广泛的应用价值。

美国杜邦公司的 Wallace Carothers 得知蚕丝是由氨基酸通过一种称为“酰胺键”的化学键连接起来形成的高分子后，就决定创造酰胺键连接的高分子，但是他没有用天然的氨基酸，而是采用了更简单易得的高分子单元。他懂得如何把它们连接起来后，于1939 年发明了由成千上万单元接起来的尼龙（又称锦纶），例如由己内酰胺合成的锦纶60（也即尼龙6，是耐磨性最好的合成纤维）。



（从这里让我们学到了辩证法，量变引起质变，生命分子→无生命材料。）

另一方面是近年来药物的开发强调内源性，因为生物体本身体内具有的蛋白质不致于引起副反应，还可能有非常好的专一性而具特效，如胰岛素至今依旧是治疗糖尿病的最有效的药物。

人胰岛素是用DNA 重组技术生产的第一个医药品，它的应用减少了动物胰岛素（如牛胰岛素）产生的过敏反应和其他在长期治疗中出现的有害反应。这些优点使其在英国的应用率为80%，美国为60%。目前在世界范围内，动物来源的和重组产生的胰岛素（人）都同时得到应用，但是重组产生的胰岛素的好处尚待证明，因为人胰岛素临床才几年（7～8 年），就遇到了意想不到的问题：据1989 年10 月美国《经济学家》杂志报道，有19 名青年糖尿病患者死于突发性低血糖，值得注意的是他们全都应用了人胰岛素。研究人员认为人胰岛素比动物胰岛素进入体内作用更迅速，产生效果更快，所以使用起来也就更危险。这促使人们从给药部位、给药方式等来解决其所产生的不良后果，如透皮给药、使用胰岛素输入器、体内植人胰岛素定量释放（或脂质体等）。

第三，蛋白质有各种非常优越的特性，可作为工农业生产中的有效物质而加以利用。特别是作为蛋白质的酶，能在十分温和的条件下，专一性而高效地催化化学反应，一直是人们孜孜不倦寻找的手段。近年来生物工程技术发展迅速，而生物工程所要解决的产品中绝大部分是各种各样的蛋白质。

第四，蛋白质的知识是普遍有用的。蛋白质的研究手段与思想方法正被其他领域相当广泛地采用，从事各种研究领域的生物学家、医学专家、化学专家及工程学家正在进行着模拟蛋白质的研究。

在生物体这部活的机器中，蛋白质扮演了各种不同功能的工作部件的角色，没有蛋白质就没有生命。蛋白质的功能是多种多样的，为了适应这些不同的功能需要，不同的蛋白质需具有不同的性质，有的溶于水，有的溶于盐溶液，也有的溶于脂肪双层之中，分子大小和分子形状也很不一样。有人估计组成一个复杂的高等生物大致需要近百万种蛋白质。

有趣的是蛋白质分子的一级结构却不太复杂，它的基本结构是长链状的肽链，而肽链是由氨基酸通过肽键连接而成的。能构成蛋白质的氨基酸种类也不多，只有20 种，而它们的结

构有几个共同点：(1)它们的氨基与羧基都连接在一个碳原子上，(2)从立体结构上看都是L型。20种氨基酸按不同的排列次序，以不同的数量形成了种类庞杂的蛋白质。从20亿年的地球进化过程中，自然界利用化学规律，筛选出这么活跃的生物功能高分子——蛋白质，真是天工巧作，令人惊叹。

复杂而多样的蛋白质从19世纪初就吸引了科学家的关注。红血球中输送O_2的血红蛋白质是最早被研究的蛋白质之一。经过漫长的研究过程，到20世纪40年代，解决了一些基本方法问题，研究了大量纯的蛋白质的许多属性，如分子的大小、形状以及在不同条件下的溶解度和结晶能力等。这些工作以社会生产技术的高度发展为背景，同时也孕育着重大的突破。到50年代和60年代，接连出现了蛋白质研究的划时代成果。(1)F. Sanger 阐明了胰岛素分子中肽链的氨基酸排列次序，(2)L. Pauling 提出了肽链盘绕成特定的α-螺旋的模型，(3)Perutz 与 Kendrew 相继解出了血红蛋白和肌红蛋白在晶体状态时的全部原子的空间排列关系——立体结构.这一系列发现与发展，为近代分子生物学的建立提供了重要的实验基础。(4)化学合成胰岛素的成功，是几十年研究蛋白质化学结构成就的一次总结，说明从氨基酸组成到肽链中氨基酸排列次序的这一系列学说，真实地反映了客观事实。在取得这些突出成果的同时，对蛋白质进行了系统的研究，围绕着蛋白质的结构与功能关系，获得了大量的知识。在那时，蛋白质是生化研究中最热闹的领域。

蛋白质工程是在重组DNA方法用于"操纵"蛋白质结构之后发展起来的一个分子生物学分支。在一般意义上，所谓"工程"是指把纯科学知识变为实际应用的艺术和科学，但在实际研究工作中，应用研究与应用的基础理论研究很难截然分开。因此，蛋白质工程的范围包括任何旨在把蛋白质知识变为实际应用的研究和方法，其中的主体是如何"操纵"蛋白质以图搞清其结构与功能的关系，最终将之用于实际。

在目前，蛋白质工程包括四大方向的研究：

(1)利用已知的蛋白质一级结构的信息作为应用研究。这是迄今为止蛋白质工程研究中最成功的方面。例如：某些具有不同一级结构的多肽都可作为细胞内通道和细胞识别信号而起作用，这些多肽分子都较小，推测可能具有特定的三级结构，故可作为有功能的一级结构单元。据此有人利用原核细胞的信号肽直接指导牛胰蛋白酶抑制剂的分泌及适当的加工处理过程。此外，还有一类蛋白质，可对其氨基酸侧链进行改造而获得新的性质。例如，除去氧化敏感性侧链可使蛋白质趋于稳定，这可用于制造失活后对氧化稳定的蛋白质的变异体。

(2)从混变异体库中筛取和选择具有一定结构—功能关系的蛋白质。蛋白质的变异是蛋白质工程中很重要的研究内容和手段，研究者可有目的地在特定位点上使蛋白质产生变异，然后研究其结构与功能。如果有一个混杂的变异体库，也可从中筛选出具有一定结构—功能关系的蛋白质。例如：有人把对热不稳定的酶的基因转移到嗜热生物体内，然后利用酶的某些标志(如对卡那霉素的抗性)，筛选出对热稳定的酶，这既保持了酶原来的性质，又增加了热稳定性。这是改造蛋白质性质的一个成功例子。这一类研究的主要困难是变异体库的获得及筛选方法的建立。

(3)定量确定蛋白质结构与功能的关系。这是目前蛋白质工程的研究主体。这类研究的课题很广泛，包括蛋白质三维结构模型的建立、与配体的结合和酶催化的性质、蛋白质折叠和稳定性研究、蛋白质变异等等。这类研究看起来偏重理论，但对子指导实际工作意义重大。

(4)根据已知结构一功能关系的蛋白质，用人工方法合成它或其改变体。这一类工作研究的目标是要达到完全由人工来控制蛋白质的性质，目前还只能合成一些小肽。

现阶段蛋白质工程亟待解决的问题主要是发展有效的变异方法和克隆基因的表达方法。前者包括定点变异和混合变异，后者的目标是找到理想的宿主表达系统。在蛋白质分子变异方面，特别强调应重视和利用天然发生的变异体，例如大家熟知的血红蛋白质和卵类粘蛋白质的变异体。最近也发现某些糖尿病患者的胰岛素的变异体。某些信号肽由于单位点突变而引起遗传缺陷，在某些病理情况下受体也会发生变异。癌基因的产物也有发生变异的情形，等等。这些蛋白质的天然变异为进一步研究其结构一功能关系提供了很好的线索和模型。

蛋白质化学——一门古老而依然兴旺的学科。

蛋白质元素组成
- C：50%～55%
- H：6%～8%
- O：20%～23%
- N：15%～18%　平均为16%，凯氏定氮法的基础，(Kjedahl) 1 g(N)＝6.25 g(蛋白质)
- S：0～4%
- P：0～3%

三、蛋白质的分类

蛋白质的种类非常之多，为了研究方便，就出现了分类问题。曾经出现过众多的分类方法，它们各依据蛋白质分子的某一特征进行分类，但这些分类法大多因发现大量新的蛋白质而产生困难。为了有助于了解蛋白质的全貌，不妨介绍几种分类法。

1. 按分子对称性划分的分类法

球状蛋白质(globular protein)

纤维状蛋白质：又分为可溶性、不溶性蛋白质

这种分类法在蛋白质研究热衷于分子大小与分子形状的时期是十分简便有用的。其优点是简便，缺点是太笼统。

2. 按溶解性质与结构内容综合考虑的分类法

简单蛋白质

硬蛋白质

结合蛋白质

20世纪初，蛋白质的研究工作主要集中在利用蛋白质的多种不同的溶解性质而将它们分离纯化，这种分类法是那一历史时期的反映。下面介绍的按功能分类法则是蛋白质研究进入化学结构时期的反映。

3. 按功能的分类法

活性蛋白质：酶、激素蛋白质，转运和贮存蛋白质，运动蛋白质，防御蛋白质，受体蛋白质，膜蛋白质

非活性蛋白质：胶原、角蛋白质、弹性蛋白质、丝心蛋白质

这种分类法也是蛋白质研究已发展深入到了解结构与功能间的关系及蛋白质与蛋白质相互关系的阶段的反映。

4. 按组成的分类法

简单蛋白质：只由氨基酸组成

结合蛋白质：由氨基酸和其他组分如糖、脂、核酸、其他辅基等组成。

当然还有其他的分类法，在此不一一述及。分类并非是我们讨论的主题，介绍分类法的主要目的是：(1)让我们了解到蛋白质的概况；同时在各种文献中经常使用上述蛋白质的名称，因此，有了解它们的必要。(2)也可以看出蛋白质种类与功能的多种多样。(3)还可以看到将有机体看成一台机器的话，蛋白质就是机器中的多种工作部件，在机器的运转中起着十分重要的作用。

第二节　氨基酸的功能、结构、性质

一、氨基酸的功能及应用

氨基酸除了作为蛋白质的基本结构单元物质外，还有一些重要功能，如化学信息的传递(甘氨酸、谷氨酸衍生物的γ-氨基丁酸，色氨酸衍生物的5-羟色胺和褪黑激素等是神经传递素；酪氨酸衍生物的甲状腺素、存在于植物体内的色氨酸衍生物的碘乙酸等均是激素)，又如生物体内各种复杂含氮分子的氮源也来自氨基酸(如核苷、核酸中的含氮碱基、血红素、叶绿素等)，还有一些氨基酸是代谢的中间体(如精氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸分别是尿素代谢循环的中间产物)等。

另一方面，氨基酸在生产实践中也可发挥重要的作用。它的应用大致有如下几方面。

1. 在食品和饲料添加剂方面的应用

首先，它可作为饲料添加剂。谷物等食物和饲料中某些必需氨基酸如*L*-赖氨酸、*L*-苏氨酸、*L*-甲硫氨酸和*L*-色氨酸等往往不足，因此为了保证充分的营养价值，通常需要补充这些氨基酸，这是当前氨基酸的主要应用之一。另一类应用则是作为调味品、甜味剂等。最为人们所熟知的氨基酸类调味品是千家万户常用的味精，它是谷氨酸钠盐，可作为调味剂的还有*L*-甘氨酸、*L*-苯丙氨酸等。近年来，人们还在致力于开发低热量甜味剂，一种新型氨基酸类甜味剂——*L*-天冬氨酸-*L*-苯丙氨酸甲酯特别引人注目，因为它的甜度为砂糖的150倍以上，但产生的卡路里只有砂糖的1/200，适于糖尿病患者和肥胖人食用。在这类应用中值得提到的还有半胱氨酸，利用它的还原性可使面包的焙烘加工有较好的质量。

2. 在医药方面的应用

包括两方面：一是作成输液供给各种病人，过去主要由必需氨基酸组成，现在一般认为非必需氨基酸也是必要的。另一方面是直接用于治疗，例如*L*-精氨酸能通过诱导肝中的精氨酸酶减轻高血氨和肝疾患，*L*-半胱氨酸可用于治疗支气管炎和鼻粘膜炎，面*L*-谷氨酰胺和*L*-组氨酸则对治疗胃溃疡有效。

3. 在化学工业方面

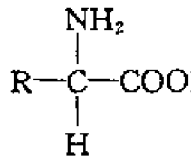
丝氨酸可用作化妆品，氨基酸的衍生物如多聚-γ-甲基谷氨酸可用于制作合成革，此外还可用于生产表面活性剂、杀菌药和杀虫药等。

关于氨基酸的获得，一般说有3种可能的途径：一是水解蛋白质；二是化学合成；三是生物合成。第三条途径又可分为：直接发酵法，即以葡萄糖之类的物质为发酵培养基，通过菌的生长发酵以产生相应的氨基酸，目前*L*-谷氨酸、*L*-赖氨酸的生产主要是采用这种方式；前体转化法，即利用氨基酸的前体中间物为出发原料，通过微生物作用转化为相应的氨基酸，如邻氨基苯甲酸转化为色氨酸；酶促直接转化法，例如利用大肠杆菌天冬氨酸酶催化延胡索酸转化为*L*-天门冬氨酸。在酶促转化方面，现在的趋势有2种：一是半合成法和酶促法相结合，如*L*-赖氨酸的生成就可先通过化学法合成*D*/*L*-氨基环己酰胺，然后再通过消旋酶和水解酶的作用得到所需要的赖氨酸；另一趋势是开发固定化酶（菌体）的应用，如*L*-天冬氨酸的生产现在多采用固定化天冬氨酸酶催化。

氨基酸的应用和生产近年来发展很快，按照1981年的统计，全世界氨基酸年销售额约达20亿美元。

二、天然氨基酸的主体结构

1. α-氨基酸



。20种天然氨基酸见图3-1。

2. α-碳是手性碳

氨基酸的立体异构导致蛋白质有构象，表现出反应特性和生物学功能。试想如果是β-氨基酸，那么肽链中可以旋转的单键又增加一个，11个β-氨基酸构成的肽链中，则旋转的单键就有$3n-2$个，结果位阻明显减少，肽链有更大的可卷曲性，这样β-氨基酸构成的肽链带来的将是另一个完全不同的世界。那些ω-氨基酸构成的肽链则是我们熟悉的尼龙王国，这一极端可以作为一个量变到质变的例证。

3. 大部分氨基酸为*L*型，可能是进化方面的原因

但*D*与*L*型对映体仅表示手性碳连接的4个基团的相对位置，与偏振光偏转方向的正、负无直接关系。对于*D*与*L*型的对映体，其熔点、溶解度及其他物理性质均相同。

4. R基不同是氨基酸分类的依据

根据R基的水溶性又分为亲水性氨基酸、疏水性氨基酸，在一定介质中根据R基带电荷情况可分为酸性氨基酸、碱性氨基酸、中性氨基酸，还有根据生理过程分为必需氨基酸（8+2种）、非必需氨基酸（10或12种）等。

5. 天然氨基酸只有20种

蛋白质是20种*L*-(α)氨基酸的共聚物。为什么自然界的蛋白质只由20种氨基酸组成，而且是清一色的*L*型的α-氨基酸，目前尚无确切解释（细菌细胞壁中有*D*-谷氨酸）。蛋白质彻底水解后的产物分析有200多种氨基酸，那么为什么说蛋白质只由20种氨基酸组成？根据什

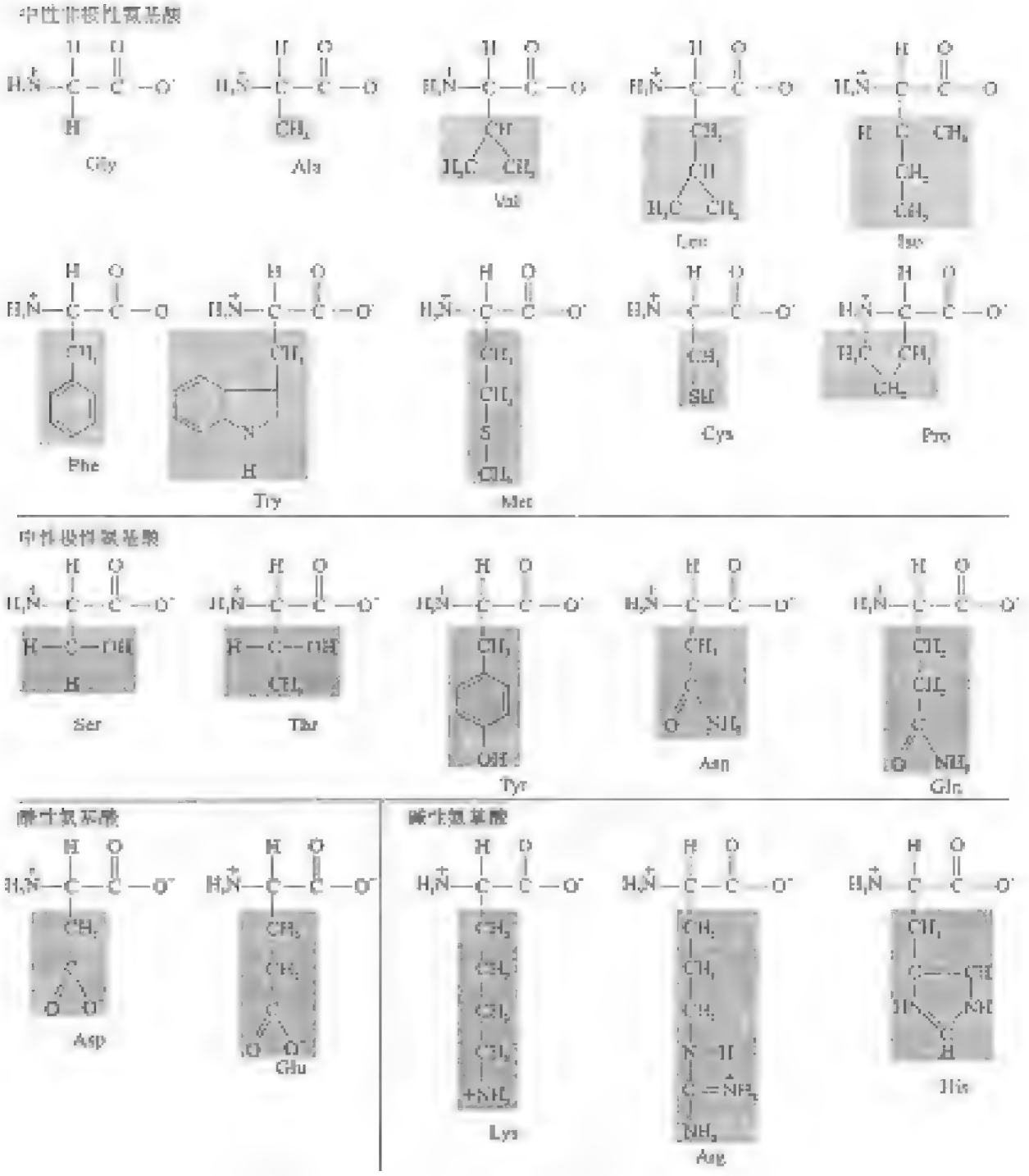


图 3-1　20 天种天然氨基酸

么？

不能根据 R 基的不同，或根据取代基的性质、位置等来决定。

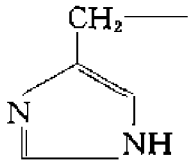
例如：—H_2C—⬡　苯丙氨酸与酪氨酸　—H_2C—⬡—OH

—CH_2—SH 半胱氨酸与甲硫氨酸—CH_2CH_2—S—CH_3

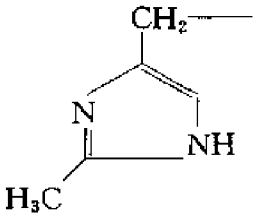
—CH_2—OH 丝氨酸与苏氨酸—$CH(CH_3)$—OH

—H 甘氨酸与丙氨酸—CH_3

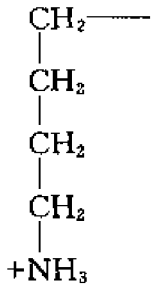
这些都是天然氨基酸的，或说基本氨基酸，均属20种之列。但下列几组氨基酸左纵列是天然(基本)氨基酸，而右纵列则否。



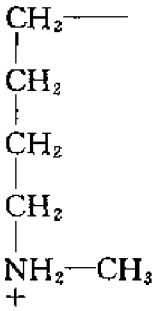
组氨酸与



甲基组氨酸



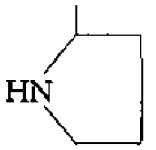
赖氨酸与



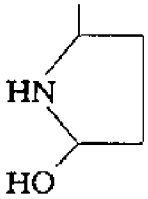
甲基赖氨酸

HS-CH_2-半胱氨酸与-CH_2-S-S-CH_2-胱氨酸

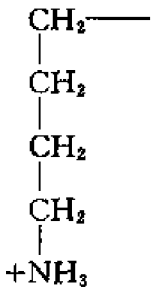
(两个半胱氨酸形成—S—S—)



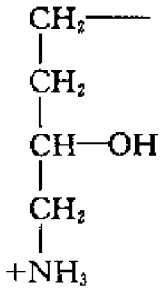
脯氨酸与



4-羟脯氨酸

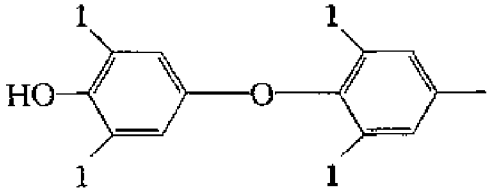


赖氨酸与



5-羟赖氨酸

丙氨酸与



甲状腺素

右纵列这些R基形成的氨基酸是在合成蛋白质以后被修饰的，所以不能单独算为一种

天然氨基酸。在合成蛋白质时，只有20种天然*L*-(*α*)-氨基酸。

值得一提的是，核酸—蛋白质检测仪仅两个波数(紫外吸收仪)：

254 nm为核酸的特征吸收峰，主要是由于碱基嘌呤、嘧啶分子中存在着共轭双键。

280 nm为蛋白质的特征吸收峰，主要是蛋白质R基中含苯环的氨基酸如酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸有特征吸收所致。

三、氨基酸的电离

氨基酸是两性电解质，在水溶液中存在多个电离平衡。

1. 等电点pI

是各个氨基酸的特征值(氨基酸不同则pI不同；使氨基酸不带净电荷状态下，溶液的pH称为该氨基酸的pI)

在pI时，氨基酸的溶解度最小，易沉淀，是制备分离的基础，例如味精生产过程、谷氨酸的分离纯化工艺就是依据此性质而设立的。

利用多种氨基酸的pI不同，可以通过电泳法、离子交换法等在实验室或工业生产上进行混合氨基酸的分离制备。

2. 不同氨基酸的pI值计算

(1)单—COOH，单—NH_2的氨基酸：pI显然在pK_1与pK_2之间

$$pI=\frac{1}{2}(pK_1+pK_2)$$

注：对于氨基酸的解离，K_1、K_2、K_3相对应的基团是

①—COOH先解离，如有2个—COOH，其中*α*-碳上相连的—COOH先解离，定为K_1，分子链上另一个—COOH的解离定为K_2。

②—NH_3^+后解离，如有2个—NH_3^+，也是其中*α*-碳上相连的—NH_3^+先解离，定为K_2(或K_3)，而分子链上另一个—NH_3^+的解离则定为K_3。

(2)双—COOH、单—NH_2的氨基酸

$$pI=\frac{1}{2}(pK_1+pK_2)\quad(K_3\text{—}NH_2\text{的解离不计})$$

(3)单—COOH、双—NH_2的氨基酸

$$pI=\frac{1}{2}(pK_2+pK_3)\quad(K_1\text{—COOH的解离不计})$$

注：似乎对于双—COOH、单—NH_2或单—COOH、双—NH_2的氨基酸来说，pI值只与“双”有关，而与“单”无关。

例如：双—COOH、单—NH_2的氨基酸，其$pI=\frac{1}{2}(pK_1+pK_2)$

K_1—*α*-C上的—COOH解离常数

K_2—分子链上另一个—COOH解离常数

K_3—*α*-C上的—NH_3^+解离常数

pI只与K_1、K_2有关，也即只与两个—COOH的解离有关，而与K_3(—NH_3^+的解离)无关，也即与—NH_3^+(单—NH_3^+)的解离无关。

同理：单—COOH、双—NH_2 的氨基酸，$pI=\frac{1}{2}(pK_2+pK_3)$

K_2—α-C 上—NH_3^+ 的解离常数

K_3—分子链上另—NH_3^+ 的解离常数

pI 与 K_1(—COOH 的解离)无关。

四、氨基酸的化学性质——氨基酸的反应

1. 氨基(—NH_2)的反应

(1)与茚三酮反应：显紫蓝色，可用于定性定量分析。

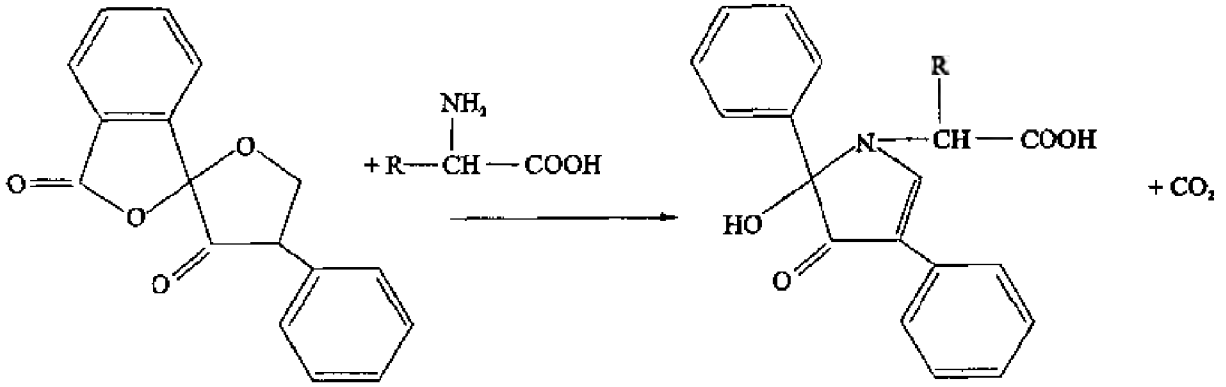
(2)氨基的酰化反应较容易：乙酰氯(CH_3COCl)、醋酸酐、苯甲酰氯、邻苯二甲酸酐都可作为酰化剂，生成氨基酸衍生物。

(3)与二硝基氟苯反应：生成二硝基苯代氨基酸(DNP—氨基酸)，呈黄色。这一反应在蛋白质化学的研究历史上起过重要作用，当年Sanger 大量使用这一反应测出第一个蛋白质——胰岛素的一级结构而于 1958 年获诺贝尔化学奖，现在该反应依旧是蛋白质端基测定(N 端)的方法之一。

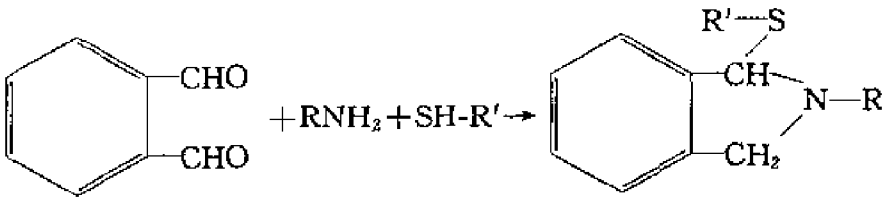
(4)与荧光试剂反应

①与5-(二甲胺基)萘-1-磺酰氯(Dansyl Chloride)——简写为DNS—Cl(也译成丹酰氯)反应，反应机理与酰化氨基的反应机制相同，生成DNS-氨基酸，有强的荧光，激发波长是360 nm，反应灵敏，可微量分析。

②荧光胺(Fluorescamine)本身无荧光，但与伯胺结合后有荧光。



③近年来，邻苯二甲醛与氨基的反应受到重视。



推测可能的产物，有荧光。

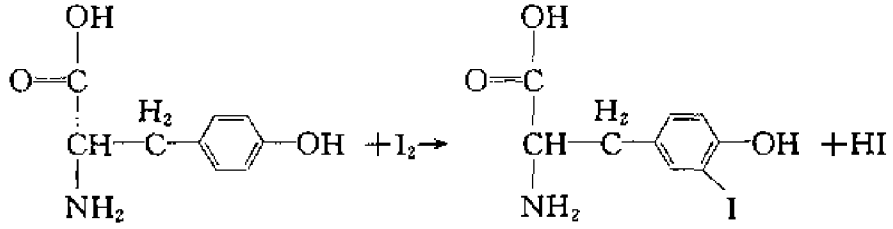
2. 羧基(—COOH)的反应

羧基的反应用来分析或研究氨基酸的不多，只是在合成肽的反应中用得多，主要是酯化，如甲酯，乙酯等。

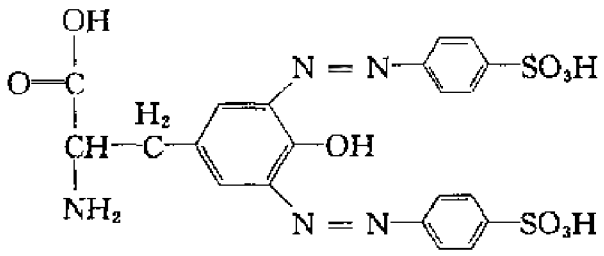
3. 侧链官能团的反应

侧链官能团的反应相当多，有一些反应相当有用，特别是利用氨基酸侧链的化学性质，用各种化学试剂来修饰蛋白质。

(1)碘化：酪氨酸侧链的酚基可被 I_2 碘化。

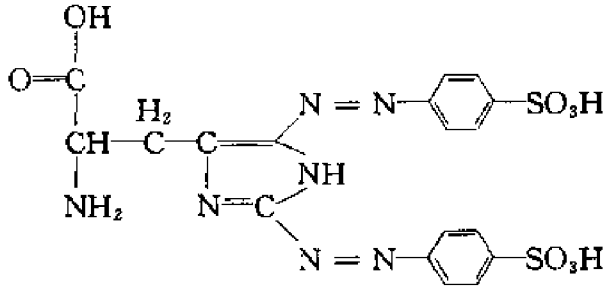


(2)重氮化：如酪氨酸侧链与重氮化的对氨基苯磺酸反应生成橘黄色产物。



这就是常用的 Pauly 反应。

另外组氨酸侧链的咪唑环也有相似的反应。



(3)酰化：如酪氨酸侧链的酚基能进行各种酰化反应，生成酯。

(4)二硫键形成：巯基及二硫键的性质对蛋白质化学来讲是重要的。它们之间可以相互转换：$2RSH-2e \rightleftharpoons R—S—S—R+2H^+$

①巯基能与许多金属离子结合，许多蛋白质的活性中心涉及巯基，在制备这类蛋白质时，要注意不可将重金属离子带入。

②许多还原剂易将二硫键还原成巯基：如 Zn/HCl，Na(Hg)，Na—液氨等。

③二硫键用过甲酸氧化，变成磺酸，产物便不能再还原成巯基。

五、氨基酸的定性、定量分析

1. 定性分析

(1)主要用双向薄膜层析，将氨基酸全部分开，然后用显色反应将氨基酸的位置找到，就能鉴定是何种氨基酸。

(2)另一方法是用一向电泳另一向层析组成的方法来定性分析，支持物一般都用层析滤纸。

近年来改进了薄层层析，支持物为聚酰胺薄膜。先用二硝基氟苯(FDNB)将氨基酸转化成DNP-氨基酸，然后再将它们用双向层析分开。不需显色，因为DNP-氨基酸本色显黄色(除0-DNP-酪氨酸及咪唑-DNP-组氨酸的层析无色外)，在肉眼观察不到的情况下，在紫外灯下观察，可提高灵敏度。

2. 定量分析

20世纪50年代以前，要定量地分析氨基酸是一项十分艰巨的工作。20世纪40年代出现了离子交换树脂，在50年代初期，Moore和Stein进行了长期的研究，利用离子交换法来分离氨基酸，取得了成功，使氨基酸分析的方法大为简化。在50年代末期，利用这一方法设计出了氨基酸自动分析仪，使氨基酸分析的工作变成了实验室的常规。

我们知道，氨基酸的可解离基团的pK值相互间有些小的差别。将氨基酸交换到离子交换树脂上后，可以选择适当的洗脱剂，将氨基酸先后不同地逐个洗脱下来，洗脱的同时，用茚三酮与洗脱液混匀反应，同时用分光光度计定量测出氨基酸。从洗脱峰出现的先后可以判断是什么氨基酸，可以定性分析；从光吸收值大小，可以定量测定。

离子交换树脂大多数用磺酸型阳离子型，早年用的层析柱很长(150 cm)，洗脱液分成几段：

①pH 3.25，0.2 mol/L 柠檬酸钠缓冲液：洗脱酸性氨基酸及个别侧链带-OH的氨基酸。

②pH 4.25，0.2 mol/L 柠檬酸钠缓冲液：先洗脱脂肪族氨基酸，然后洗脱芳香族氨基酸。

另一根柱(30～50 cm)：pH 4.26，0.3 mol/L 柠檬酸钠缓冲液，洗脱碱性氨基酸。

20世纪60年代末，高压液相层析得到迅速发展，树脂也有极大的改进，无需长柱，只需柱长15 cm，已能将全部氨基酸分离。洗脱液基本上还是分成几段，由于苏氨酸和丝氨酸在短柱中不易分开，在相应的洗脱液中加入酒精，解决了分离的问题。显色剂仍然是茚三酮，可以准确到毫微克分子的氨基酸。

近年来不断有人尝试用荧光胺和邻苯二甲醛来取代茚三酮反应，这两个试剂与氨基酸的结合产物都显荧光，因此可以提高灵敏度。荧光胺可测出10×10^{-12} mol的氨基酸，邻苯二甲醛甚至更为灵敏。此外，荧光胺与氨基酸的反应在室温下进行(茚三酮与氨基酸反应需100 ℃，pH 5左右，所以仪器需要有加热装置)，仪器的设计也简单。但因茚三酮的仪器发展得比较完善，要取代它并不容易。

六、蛋白质与多肽的界线

蛋白质逐级水解的产物依次是：蛋白质→胨→胨→肽→α-氨基酸。

蛋白质和多肽就化学键结构讲是一样的，都是氨基酸通过肽键连结成的分子，所不同的是一般前者分子量大，后者分子量小，但是蛋白质和多肽是两类性质不同的物质。从小肽开始，随着分子量的变大，大到某一程度后性质就有飞跃，出现了新的性质。从多肽到蛋白质，这又是一个有说服力的证据，说明量变到质变的规律。

多肽链要多长才能发生飞跃，转变成蛋白质呢？阐述清楚这个问题，不仅对蛋白质的研

究有重要意义，对于生命与生命物质的起源也有重要意义。

蛋白质是由氨基酸之间脱水形成的以肽键连结起来的功能性生物大分子物质，2个氨基酸相连的叫二肽，由多个氨基酸相连就是多肽。当氨基酸个数多到一定程度，有的教科书中说大约达到100个以上的，也有的说分子量达到一万左右的或以上的，就是蛋白质。有些教科书中甚至干脆称"多肽与蛋白质没有严格的区别"，但又不承认二者完全等同，可以互相通用。实际上的确在一些大肽和小蛋白的具体阐述中存在着明显的混乱，例如胰岛素单个亚基分子量接近6 000，在有锌离子存在时缔合成二聚体的分子量就约为12 000，那么它属于大肽呢？还是属于蛋白质呢？从20世纪20年代发现了胰岛素到50年代阐明它的一级结构，60年代在我国第一次实现了它的人工全合成，70年代通过X一光单晶衍射高分辨地阐明了它的空间结构，毫无疑问上述这些研究成果都可称为本世纪的重大科学成就之一。中外学者们在论述这些成就时，虽然大多数人把它列为蛋白质，但也有人至今仍将其说成是大肽、多肽。不同的学者各有不同的理由和认识，本不足为奇，令人费解的是往往同一位学者，在同一篇论述中一会儿称其为"最大的多肽"，一会儿又称其为"最早阐明了一级结构的最小的蛋白质"，由此足见人们（包括一些颇有成就的专家在内）在"多肽"与"蛋白质"的概念上的混乱。那么"多肽"与"蛋白质"在概念上有没有必要进行区别？有没有区别？如果有区别那么二者质的区别在哪里？

根据习惯，过去认为是多肽的仍为多肽，叫蛋白质的还叫蛋白质，是必说法不一；按约定俗成的办法，指出大约100个氨基酸以肽键相连，分子量达到10 000以上的叫蛋白质。后者看来似乎有了量的尺度，但实际上未能阐明量变到质变中"质的飞跃"在何处，那么99个，98个…氨基酸的又如何呢？怎样划界呢？分子量10 000的尺度也有同样的问题，它们与分子量略小的"多肽"有什么质的不同呢？况且还有单一种或几种氨基酸制得的多聚或共聚的氨基酸，也是以肽键相连的，分子量可以超过10 000，氨基酸个数超过100个，按上述"量的尺度"判断，理所当然列入蛋白质范畴，但从性质上看它们与蛋白质显然不同，只能叫多聚氨基酸（poly amino acids）。

人们认识物质的相互区别，总是从物质所表现出的物理、化学、生物学等性质的差别来区分的。这些性质的本质则是构成各种物质的组成，特别是特殊的结构所决定的，结构是其内在本质，而性质则是外部表现形式。从这里能否找到更合理的关于多肽与蛋白质的概念区分呢？

胰岛素（分子量约6 000）、绿豆胰蛋白酶抑制剂（分子量6 500）、蛇毒毒蛋白（分子量7 500）、氧化还原素（分子量6 000）等等是蛋白质，这是公认的。二十几个残基以下的属多肽或肽，这也没有什么可争论的。这两类物质之间的差别何在？就在于蛋白质有特定的构象，蛋白质的特定的生物功能与它所具有特定的构象紧密相联系；可是肽不同，它在溶液中的构象浮动性很大，有时甚至是在几种构象之间摆动，它的构象可能在发挥活力时才显出作用，因此经常是将肽的一级结构与生物活力直接联系。

既然如此，那29个残基的胰高血糖素（分子量3 500）又将何属？从空间看，它有构象，但它的构象浮动性大。有人根据它的构象，认为它是蛋白质。有人认为它的构象浮动性太大，应是多肽。恩格斯在论述生物进化和物种分类时指出："一切差异都在中间阶段融合，一切对立都经过中间环节而互相过渡。对自然观的这种发展阶段来说，旧的形而上学的思维方法就

不太够了。辩证法不知道什么绝对分明的和固定不变的界限，不知道什么无条件的普遍有效的'非此亦彼'！它使固定的形而上学的差异互相过渡，除了'非此即彼'，又在适应的地方承认'亦此亦彼'，并且使对立互为中介。辩证法是惟一的、最高度地适合于自然观的这一发展阶段的思维方法。"根据恩格斯亦此亦彼的论述，可以理解，新事物中包含了旧事物的某种痕迹。最小的蛋白质虽然具有特定的空间结构，但它又包含了多肽构象浮动性的痕迹。基于这种分析，胰高血糖素是一个过渡类型的物质。虽然它包含了多肽的某些属性，但丝毫也不能否定它有蛋白质的各种属性，它正好处在质变点上。

促肾上腺皮质激素（ACTH，分子量4 700）是多肽，这是公认的。但ACTH是三十九肽而胰高血糖素是二十九肽，后者有蛋白质属性，前者却是多肽。这里让我们学到了辩证法。量变到质变，但质变点的选择又不能用一个简单的数量来表示，这是因为量中包含着质。残基数量相同，但一级结构不同，会出现不同的质。不能用简单的数量来表示这一质变点。

近年来从各种来源发现了许多50个残基左右的肽链分子，对它们进行构象分析将对这一问题的深入研究做出贡献。

还需提及，不能认为多肽的空间结构问题毫无意义。近年来对这一问题已开始加以重视，对肽的构象进行了测定。有人设想，多肽激素与受体结合后形成特定的空间结构，肽的功能与形成这种构象有密切关系。这种设想告诉我们，要看到蛋白质和肽的质的不同，但又不能把这种质的差异看绝对了，特别是有些肽它的前体是蛋白质，这又将二者联系了起来。这种现象使人体会到，自然界本身充满着辩证法。

第三节　蛋白质的性质

一、胶体性质

蛋白质是α-氨基酸的高聚物，由于分子量大，它在水溶液中所形成的颗粒（直径在1～100毫微米之间）具有胶体溶液的特征——布朗运动、丁道尔现象、电泳现象，不能透过半透膜以及具有吸附能力等。

蛋白质颗粒大，比表面较大且比表面分布多种极性和非极性基团，具有较强的吸附能力；同时蛋白质表面带极性基团，具亲水性，形成水化层、水膜层使蛋白质颗粒隔开、不碰撞而聚凝；蛋白质表面带有相同电荷，具斥力，使蛋白质稳定存在于溶液中。

该性质的应用价值：透析（不通过半透膜）除小分子，这是实验室或工业生产上提纯蛋白质常用的方法。（注：透析与层析虽一字之差，但含义相差甚远）。

二、酸碱性质

蛋白质是两性胶体，是体内最大的缓冲体系。人体血液能大致维持在中性主要是由于蛋白质两性胶体的缓冲作用。

蛋白质如同氨基酸那样，是两性电解质，既能与酸作用又能与碱作用。蛋白质分子中可解离的基团除N端、C端外，主要是肽链氨基酸残基上的侧链基团，因此蛋白质是两性物质。

呈两性的物质在一定条件下分子中的净电荷为零，在电场中，蛋白质既不向阳极移动也不向阴极移动，这时溶液的pH称为该蛋白质的等电点pI。

蛋白质的pI与氨基酸的pI的不大一样，它不是一个恒定值。(1)聂剑初等的《生物化学简明教程》第28页中这样写："各种蛋白质具有特定的等电点，这是和它所含的氨基酸种类和数量有关的。如果蛋白质分子中含碱性氨基酸较多，pI偏碱性，如果蛋白质分子中含酸性氨基酸较多则pI偏酸性，含酸、碱性氨基酸残基数目相近的蛋白质，pI约5.0左右，即中性偏酸。"(2)沈同的《生物化学》上册第134页中写道："观察到的蛋白质的pI在一定程度上取决子介质中的离子组成，没有其他盐类存在下蛋白质质子供体基团解离出来的质子数与质子受体基团结合的质子数目相等时的pH，称为等离子点(Isoionic point)。等离子点对每种蛋白质是一个特征常数。"(3)陶尉孙等的《蛋白质分子基础》第21页写道："处于等电点的蛋白质，其分子的正负电荷并不完全由蛋白质本身的正负电荷基团所贡献，蛋白质不仅同H^+结合，而且也和溶液中的其他离子结合，尤其是和缓冲液中的阴离子结合，这样，由子结合缓冲液中的阴离子多于阳离子，就增加了蛋白质的负电荷，直接影响了等电pH值。结合的阴离子愈多，等电pH愈向低值移动，因此等电点不是一个恒定值，它依赖于所用的缓冲液及其浓度。"

等离子点或叫等离子pH值是除盐的纯蛋白质水溶液的pH，这样蛋白质的带电状态完全由H^+的解离和结合来决定，排除了其他离子对蛋白质带电状态的干扰，因此等离子点是特殊的等电点。蛋白质溶液通过离子交换混合床后，或长时间的以无离子水透析都可以得到等离子蛋白质溶液，测定此溶液的pH值称为等离子pH值。但在无中性盐存在时，许多蛋白质是不溶的，所以直接测定等离子点比较困难，往往采取间接测定不同盐浓度下的等电点然后外推至零浓度的方法，得等离子pH值。

实际上，处在等离子pH的蛋白质也并非都是净电荷为零(但等电点时净电荷为零)。一般来讲，等离子pH值都落在pH 3～9的范围内，其中只有pH＝7时等离子蛋白质的净电荷才真正是零。一般说来，等离子点和等电点虽然不同，但数值差别不大。蛋白质在等电点时，以两性离子的形式存在，其总净电荷为零。这样的蛋白质颗粒在溶液中因为没有相同电荷相互排斥的影响，所以最不稳定，溶解度最小，极易借静电引力迅速结合成较大的聚集体，因而沉淀析出。这一性质常在蛋白质的分离提纯时应用。同时，蛋白质在等电点时的粘度、渗透压、膨胀性以及导电能力均为最小。

三、蛋白质的分子量

蛋白质的分子量一般在1万～100万之间。测定小分子物质分子量的方法(如冰点降低、沸点升高等方法)已不用于测定蛋白质的分子量。应当利用蛋白质的物理化学性质测定蛋白质的分子量，其方法主要有：

(1)渗透压法：设备简单但灵敏度较差。

(2)超离心法：比较准确可靠但需要超速离心机。

(3)凝胶过滤法：要求一定设备。

(4)聚丙烯酰胺凝胶电泳。

下面简单介绍超离心法、凝胶过滤法和SDS电泳法测定蛋白质分子量。

1. 超离心法：沉降速度和沉降平衡法

(1)在沉降速度实验中，若转速达到50 000～60 000 rpm时，在离心池中均匀分布在溶剂中的蛋白质分子将以一定速度移向离心池的底部。在如此高速的离心力场中，反向扩散可以忽略。在离心池顶部由于溶质分子的离去，仅剩下溶剂。在离心池下部为浓度均一的蛋白质溶液部分，称为"坪区"(图3-2)。在上层溶剂与下层"坪区"之间有一个窄的过渡区带。在这个区带内，沉降物质的浓度随区带向池底部移动而增加。这个区带称为界面。不同分子量物质的混合物能够形成几个界面。分子量越大的物质，界面移动越快。沉降速度法就是利用光学方法来测定这个界面的移动速度。物质的分子量不同，沉降系数不同。物质的沉降系数与该物质分子的大小、形状和密度以及介质的密度和粘度等因素有关。如果溶质分子的密度比溶剂的密度小，离心时溶质分子上浮，沉降系数则为负值。

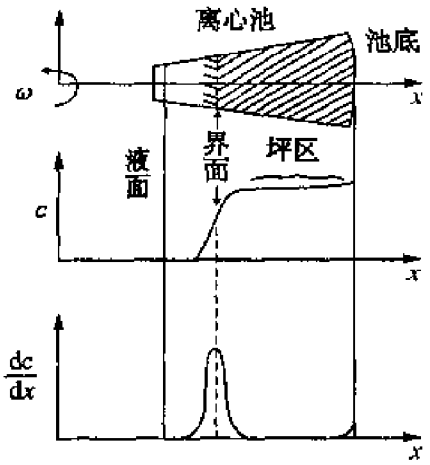


图3-2 在沉降过程中扇形孔离心，池内溶质浓度的分布

c：浓度；*x*：距离；*ω*：角速度

$$M=\frac{STR}{D(J-v\rho)}$$

S：沉降系数(量纲为秒)

R：气体常数(8.314×10^{7} J/K·mol)

T：绝对温度

D：扩散系数

J：溶液分子的微分比容(等于溶质分子密度的倒数)

ρ：介质的密度

v：溶质分子的微分比容(等于溶质分子密度的倒数)

可见：$M\propto S$

S(沉降系数)指单位(cm)离心场里的沉降速度，1S单位$=1\times10^{-13}$ s，因此8×10^{-13} s的沉降系数用8S表示。沉降系数的大小与蛋白质的分子量和形状等特征有关。

(2)沉降平衡法测定分子量是在低速离心下进行。在低速(7 000～8 000 rpm)离心条件下，沉降分子向离心池底部移动的速度很小，另一方面，由于溶质分子在沉降时产生了浓度梯度，因而引起了与沉降相反方向的扩散，两个相反方向移动的溶质分子的量，在一定时间内达到平衡状态。在理想的平衡条件下，测得在沉降平衡时溶质浓度的分布，即可以直接计算分子量，并不需要扩散系数。这点与沉降速度法不同，但是二者都需要溶质分子的微分比容数据。

2. 凝胶过滤

是基于多孔凝胶的分子筛作用而被广泛应用的一种液相柱色谱。它是根据样品中各种蛋白质分子量大小的差异来进行分离的。对于分离不同分子量范围的蛋白质，要选择合适的凝胶孔度。当欲分离的物质通过色谱柱时，分子量不同的物质在柱中受到固定相的阻滞作用

不同：分子量大的只能沿溶胀胶颗粒间的孔隙随溶剂流动而不能渗入凝胶颗粒内部，故阻滞作用小，流程短，移动速度快而较早流出色谱柱；分子量小的则可渗入凝胶颗粒，故阻滞作用大，流程长，移动速度慢而较后流出色谱柱。分离效果常用洗脱曲线表示。分离特性直接和洗脱体积有关。由于这种方法是依靠溶液分子的有效移动和扩散进行的，样品和洗脱液的粘度都必须很低。

最常用来进行分子量测定的凝胶是交联葡聚糖(Sephadex)，聚丙烯酰胺凝胶(Bio-Gel P)用得也不少，琼脂糖凝胶(Sepharose 或Bio-Gel A)用得较少。其基本原理是先利用一些已知分子量的蛋白质，测定其在某一型号凝胶柱内的洗脱体积V_e，再用完全排除于胶孔之外的大分子(常用蓝色葡聚糖-2000，平均分子量2×10^6)测出V_0(外水体积)，从而得到一系列V_e/V_0值。再用这些比值对每种蛋白质分子量(M)的对数lg M作图，可得一直线，即所谓标准曲线。然后再在同样条件下，测出未知蛋白质的V_e值，从而得到未知蛋白质的V_e/V_0，再由标准曲线上查得分子量值。

3. SDS-PAGE(Polyacrylamide Gel)电泳

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中，蛋白质的迁移率与其所带电荷及分子大小有关。但可能有这样的情况：各个分子量不同的蛋白质以相同的速度向阳极移动，这可能是由于蛋白质分子大小的差别被它们所带净电荷的差别所补偿。为了克服这个弱点，Shapiro 等人试图在SDS 存在的条件下分离蛋白质混合物，他们的初步工作结果促使 Weber 等人测定了大约40种蛋白质在SDS 存在时的电泳迁移率，他们发现，这些蛋白质的电泳迁移率与它们的分子量的对数呈线性关系。

在SDS 溶液中，于100 ℃加热蛋白质(通常加入一定量的巯基化合物以还原所有二硫键)，这样把所有肽链之间的连接完全解离开。在这个过程中，多肽链结合大量的SDS，从而带上强的负电荷，产生了恒定的负电荷对质量的比率。将上述样品在SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳时，SDS-多肽复合物的迁移率在一般情况下取决于分子量的大小。由于这个原因，产生了分子量和电泳迁移率的经验关系，即：分子量的对数与相对迁移率成一定比例关系。使用已知分子量的标准物作标准线或用计算法确定标准线的常数，即可求出未知样品的分子量。

显然，这种方法测定的是亚单位肽链的分子量。

SDS 是阴离子去污剂(十二烷基硫酸钠)，它能与蛋白质的疏水部分相结合，并能将大多数蛋白质拆成组成它们的亚单位形式。由于SDS 的结合使变性的无规则盘绕的多肽链获得了大量负电荷，而这些负电荷基本上屏蔽了没有 SDS 时正常存在的任何一种电荷。

SDS-PAGE 电泳法成功的确切原因尚不清楚，但它已被广泛地用在纯蛋白质的亚单位组成和分子量测定中。用此法测定分子量时，至少要有3～4 种标准蛋白质，而且它们的分子量要分布在未知蛋白质的各侧。

迁移率 $R=\dfrac{d_s}{d_0}$

d_s：样品迁移距离

d_0：前沿迁移距离(小分子染料)

$\lg M=a-bR=a-b\dfrac{d_s}{d_0}$

从几种标准样品的 R 值和分子量对数，即可求得 a、b 两个常数，从而可进行未知物分子量的计算。

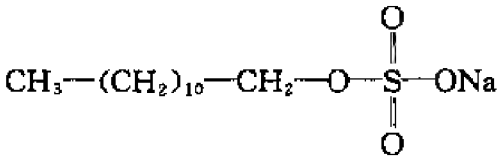
优点：快速，用量少，并可同时测定几个样品。

缺点：误差较大，主要是由前沿和样品迁移距离的测量而引起的，而这些又和电泳操作技术有着直接联系，因此对实验要求较高。

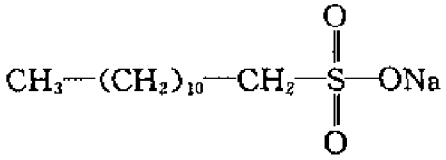
利用超离心法测蛋白质分子量是直接测定，而用凝胶过滤法和SDS 凝胶电泳法测分子量是与已知样品进行比较，是相对的测定结果。一般认为超离心法测得的结果更接近真实值。

SDS-PAGE 是测定蛋白质分子量最常用的方法。该法操作容易，设备简单，所需样品量小，结果重复性好，一般误差在±10%。随着科研的广泛开展和国产试剂质量的提高，应用国产SDS 的越来越多。但究竟SDS 是什么？众说不一。有的作者翻译注释SDS 是十二烷基硫酸钠，但也有为数不少的译著翻译注释 SDS 为十二烷基磺酸钠。十二烷基硫酸钠与十二烷基磺酸钠并不是同一试剂的两个名称，而是完全不同的两个试剂。这种混乱情况不仅使初学者不知所从，容易造成以讹传讹，而且一旦试剂选错，就不可能获得正确的实验结果。孰是孰非，实有必要辨清。

SDS 是Sodium Dodecyl Sulfate 的缩写，正确的翻译应是十二烷基硫酸钠。十二烷基磺酸钠的英文名称是Sodium Dodecyl Sulfonate，其英文字头缩写虽也可写成"SDS"，但与测定蛋白质分子量电泳中所用的SDS 全然不同。首先二者在化学组成及结构上不同，十二烷基硫酸钠的烷烃链是通过氧原子与硫原子相连的，结构式为：



而十二烷基磺酸钠的烷烃链则直接与硫原子相连，结构式为：



其次二者在性质上也有相当的差别。在SDS-PAGE 中，SDS 的重要功用有二：一是它可以定量地结合在蛋白质分子上，形成SDS-蛋白质复合物，使荷电互不相同的蛋白质具有相同密度的负电荷；二是它可以使蛋白质变性，使空间结构彼此不同的蛋白质具有相同的构象。正是基于这两点，我们才有可能根据蛋白质的相对迁移率计算其分子量。根据我们有限的实验，国产十二烷基硫酸钠经适当纯化，可以满足上述要求，获得满意的结果；而国产十二烷基磺酸钠虽经相同步骤的纯化处理，也不可能获得相应的结果。这种情况有可能使部分同志得出错误的结论，以为国产SDS 质量不高，测分子量非用进口 SDS 不可。

生物分子——氨基酸、多肽、蛋白质、核酸等都具有可电离的基团，在溶液中能够形成带电荷的离子，在电场作用下会发生移动。由于各种分子所带电荷不同，在电场中移动的速度

也就不同，这即电泳的基本原理。

- 电泳
  - 支持物电泳技术
    - 纸上电泳，醋酸纤维薄膜电泳，薄层电泳
    - 非凝胶性支持物区带电泳
      - 淀粉，纤维素粉
      - 合成树脂粉末等
    - 凝胶支持介质区带电泳
      - 聚丙烯酰胺凝胶，淀粉胶
      - 琼脂糖凝胶，琼脂凝胶
  - 不用支持物的电泳技术
    - 自由界面电泳；Tiselleas 式微量电泳
    - 显微电泳，等电聚焦（密度梯度），等速电泳技术

凝胶电泳的最大优点是它的支持物（聚丙烯酰胺一类的凝胶）的孔径可以选择，因而适用于带有相同电荷但大小和形状不同的分子的分离。

凝胶电泳从使用形式上可分为：水平式，垂直式，板形，柱形电泳，双向电泳，连续纸电泳，电泳一层析相结合的技术等。

四、蛋白质的变性

蛋白质是有生物活性的一类生物大分子，在保存或处理过程中，它的生物活性会丧失，笼统地说，这种过程叫失活。蛋白质分子在受到一些物理因素如加热、高压、表面张力的作用时，或者接触到许多化学试剂如胍、脲、酸、有机溶剂等时，会导致失活。这一类失活还伴随着其他现象的出现，如蛋白质溶解度的降低、一些物化常数的变化等等。这些变化都不导致一级结构的破坏，这种现象称为蛋白质的变性。

蛋白质变性现象的实质经过几十年的研究已清楚。早在1931 年，吴宪指出，蛋白质的变性就是它的肽链从卷曲变到伸展的过程，后来的工作都说明吴宪的说法是正确的。从现代立体结构研究结果看，可以比较完整地说，变性就是蛋白质在一定的条件下处理时，共价键不变（但可以涉及次级键，二硫键变化），特定构象改变，失去生物活性的过程。

变性研究已经历 3 个发展阶段：

第一阶段：以吴宪的变性理论（1931）为代表，主要是变性现象的观察。

第二阶段：主要研究变性与蛋白质分子形状的关系。

第三阶段：从 20 世纪 60 年代起，由于 X-光衍射技术的发展，蛋白质变性研究由分子形状的研究进入分子构象变化的研究。

1. 为什么人们对蛋白质变性研究这么感兴趣

首先，大多数从事蛋白质和酶研究的人，希望通过变性，认识并掌握变性条件，防止变性，以得到天然蛋白质制剂。——这在生物高分子提取分离中是必须考虑的因素。

其次，有些研究工作需要利用变性条件。例如不同肽链的拆离、电荷异构体（由于对残基侧链的化学修饰，而产生不同净电荷的肽链）的分离、亚单位分子量的测定、某种残基的化学反应等，都要在实验研究之前，先通过变性，把蛋白质拆成亚单位，或者把天然蛋白质变成无规构象的多肽链。

再次，利用变性过程，研究维持蛋白质二、三级结构的作用力，研究各种作用力在决定活性部位上的作用。为了这种研究，常常采用人工合成的氨基酸聚合物或者由几种氨基酸合成的共聚物作为蛋白质的模型化合物。这种模型化合物的结构单元只是一种或几种氨基酸，

二、三级结构比较单一，因而能较好地观察到从α-螺旋转变成无规卷曲的变性过程。蛋白质虽然也包含α-螺旋片段，但整个构象复杂，在变性过程中，不仅α-螺旋发生变化，其他类型的构象也发生变化，因而不利于观察到某一类型的变化。

2. 各种变性因素对蛋白质构象的影响

(1)温度——热变性，由于加热而产生的蛋白质变性原因是肽链的脱水及次级键破坏。

(2)pH——酸碱变性，通过静电作用来实现。多数蛋白质在pH 4～10内稳定。

(3)有机溶剂：可以通过静电力或氢键或疏水作用实现。按有机溶剂提供质子的能力可分为：

强质子性{有机酸：甲酸、乙酸、二氯乙酸
有机碱：氨

弱质子性{醇：甲醇、乙醇、甘油
酰胺：甲酰胺、N-甲基乙酰胺

(4)脲和盐酸胍：作用机制是使蛋白质肽链伸展而暴露出内部的巯基，破坏疏水作用。常用8 mol/L的脲，5 mol/L的盐酸胍。

(5)盐：$(NH_4)_2SO_4$、$CaCl_2$、NaCl等

盐析：SO_4^{2-}等一类离子能提高蛋白质构象的稳定性，同时也能够使蛋白质的溶解度下降。

盐溶：Ca^{2+}、SCN^-等离子能降低蛋白质构象的稳定性，同时也能够使蛋白质的溶解度增大。

中性盐如KCl、NaCl，无正负影响。

为什么有些盐对蛋白质变性有正负影响？现在还没有真正清楚，但可以从两方面考虑：一种是离子对蛋白质分子内部的极性基团的直接作用；另一种是离子改变溶剂的结构，以影响水分子与蛋白质极性侧链基团的相互作用，从而间接地影响蛋白质构象的稳定性。

(6)表面活性剂：如SDS(带负电荷)，十六烷基三甲基氨溴化物(带正电荷)。

研究变性因素的一个很有价值的应用就在于分离提纯混合蛋白质的某一组分时，常使某些蛋白质变性，沉淀除去，或使有用的蛋白质盐析下来，以达分离目的。

为什么变性蛋白质会出现各种不同现象——溶解度降低、粘度加大、生物活性丧失等？

变性的蛋白质溶解度之所以降低是因为稳定二级、三级结构的作用力(特别是氢键)断裂，有规则的空间构型松散，藏于空间构型内的疏水基团裸露于外，降低了蛋白质的水化作用，所以蛋白质的水溶性必然减小。同样，粘度增大，也是由于结构松散混乱，分子表面随着增大的缘故。生物活性丧失更不难理解，我们知道蛋白质的一级结构和空间结构是蛋白质表现生物活性的基础，如果蛋白质二级结构以上的结构都遭到破坏，当然很难再保持其原有的生物活性。

20世纪40年代以前都认为蛋白质变性是不可逆的。1945年Auson研究了血红蛋白的变性、复性，后来变性又被分为可逆和不可逆两种。

当除去变性因素后，有的蛋白质可以复性。其中一部分可完全复性，另一部分可恢复活性部位或形成几种复性产物。究其原因是一级结构决定高级结构，一级结构不被破坏，只要满足所需环境条件，就可以复性。

到目前为止，从实践上看并未做到一切蛋白质都能在变性后重新恢复活性，但一般都接受变性是可逆的概念，并认为有一些蛋白质之所以不可逆，主要是所需条件复杂，如辅因子的问题、蛋白质水解酶的彻底去除、解离缔合条件的掌握、巯基的保护等等。

3. 变性后蛋白质的构象变化

蛋白质经变性因素作用之后，其构象发生了什么变化？

吴宪在1931年提出：蛋白质变性之后，其肽链就由原来紧密有序的构象变成了松散、无序的构象。在这以后很长一段时间内，人们对变性的认识基本保留在这个水平上。20世纪50年代末，有人发现氯乙醇之类的有机溶剂对蛋白质构象的影响与有机溶剂的浓度有密切关系：有机溶剂浓度低时，变性蛋白质呈现易聚集的伸展构象；有机溶剂浓度高时，变性蛋白质又逐渐变成α-螺旋，有时其螺旋含量可以超过天然状态。这一实验结果说明，变性蛋白质的构象也可以是紧密构象，近年来，又进一步观察到，α-淀粉酶、*L*-天门冬酰胺酶等经表面活性剂变性之后，其螺旋含量增加。增加螺旋度的变性，叫重构造变性。

1968年Tantord把变性产物的构象概括为三类：

(1)呈无规则卷曲构象——如盐酸胍变性剂作用后的蛋白质。

(2)一部分紧密构象——如热、酸、碱变性剂作用后的蛋白质。

(3)螺旋度增加——如高浓度的有机溶剂变性剂作用后的蛋白质。

4. 变性的应用

蛋白质的变性利弊同存。可以利用蛋白质的变性为人类服务：豆腐就是大豆蛋白的浓溶液加热加盐而成的变性蛋白质凝固体；临床分析化验血清中的非蛋白质成分，常常加三氯醋酸或钨酸使血清中的蛋白质变性沉淀去掉；为鉴定尿中是否有蛋白质，常用加热法来检验；在急救重金属盐中毒时，可给患者吃大量乳品或蛋清；在提纯蛋白质时，可以加热除去对热特别敏感的杂蛋白质，以纯化蛋白质制剂；在食品工业上，通过变性，使大豆蛋白质由球状结构变成纤维状结构；在医疗和食品部门，有不少器具或制品需要利用变性来消毒、杀菌等。

蛋白质变性不利的一面：有些医用生物制品(疫苗、酶制剂，其他蛋白质制剂)的制备与保存，人工心肺机内循环的血液以及日常实验室和工业上用的酶制剂，都需要防止变性，因此蛋白质的稳定性问题亟待解决。机体衰老时，相应的蛋白质也逐渐发生变性，亲水性相应减弱。种子放久后蛋白质亲水性降低而失去发芽能力。

5. 抗变性手段

(1)从内因入手：内源性稳定因素，即蛋白质的共价结构以及由共价结构所决定的空间结构。

(2)从外因入手：外源性稳定因素，包括非共价结合的辅基以及环境的物理化学条件，后者如温度、压力、溶液中其他溶质如添加蛋白质(包括明胶)、树胶、底物、抑制剂、辅基、必需的金属离子以及某些盐类等。

五、蛋白质的沉淀反应

蛋白质由于带有电荷和水膜，因此在水溶液中成稳定的胶体。如果在蛋白质溶液中加入适当的试剂，破坏了蛋白质的水膜或中和了蛋白质的电荷，那么蛋白质胶体溶液就不稳定而出现沉淀。

1. 盐类

$(NH_4)_2SO_4$、Na_2SO_4、NaCl 等盐类可破坏蛋白质分子周围的水膜、中和蛋白质分子的电荷。但不同蛋白质盐析所需盐浓度不同，可进行分段盐析。

2. 有机溶剂

酒精、丙酮——破坏水膜而使蛋白质沉淀。如蛋白质溶液的 pH 在 pI 时，加入这些有机溶剂可加速蛋白质沉淀，可用于分离纯化。

3. 重金属离子

$HgCl_2$、$AgNO_3$、$Pb(Ac)_2$、$FeCl_3$ 等能与蛋白质产生阴阳静电吸引而沉淀，利用这一性质在人体重金属离子中毒时，可灌入蛋清或牛奶以解毒。

4. 某些酸类

苦味酸、单宁酸、三氯乙酸等能和蛋白质形成不溶性的蛋白质盐而沉淀。

以盐析法或在低温条件下加入有机溶剂等方法制取的蛋白质，仍然保持天然蛋白质的一切特性，故在蛋白质分子的分离纯化中低温操作是十分必要的。

六、蛋白质的颜色反应

1. 双缩脲反应

这是一个用比色法测定蛋白质浓度的方法，至今仍被广泛使用，特别是在需要快速但不需要很准确的测定中(0.5～10 mg/ml)最常用此法。

$[Cu(NH_3)_4]^{2+}$ + 蛋白质溶液→紫红色络合物，30 分钟内测 OD_{540}。

2. 福林—酚法(或称 Lowry 法)

此法是双缩脲法的进一步发展，它的第一步就是双缩脲反应，即 Cu^{2+} 与蛋白质在碱性溶液中形成络合物，然后用这个络合物还原(主要是蛋白质中酪氨酸的酚基)磷钼酸—磷钨酸试剂(即福林一酚试剂)，结果得到深蓝色物质，测 OD_{650}。

此法是生化领域里应用较广泛的一种蛋白质浓度测定方法。它的优点是操作简便(当然，相对于双缩脲法要费时)、灵敏度高，适合于测定20～400 mg/ml 的蛋白质溶液。它的缺点是试剂只与蛋白质中的酪氨酸、色氨酸反应，各种蛋白质因这两种氨基酸含量不同而使显色强度稍有不同，标准曲线也不是严格的直线形式。其另一缺点是Folin 试剂的配制较烦。

注：加入福林试剂时要特别小心，这个试剂只在酸性pH 环境中才稳定，但第一步反应(双缩脲反应)是在 pH 10 时才发生(而且下一步的还原反应也只有在 pH 10 时才发生)，因此把 Folin 试剂加到碱性的 Cu^{2+}—蛋白质溶液时，必须立刻混匀搅拌，以使磷钼酸—磷钨酸试剂在没被破坏以前能有效地被 Cu^{2+}—蛋白质络合物所还原。

3. 考马斯亮蓝法(Coomassic 亮蓝法)

不少染料可与蛋白质结合后显色，如考马斯亮蓝G250(红色试剂)与蛋白质结合呈蓝色。此复合物的吸光系数很高，这就大大增加了测定的灵敏度，可以测定几微克，甚至零点几微克水平的蛋白质，而且反应时间快，大约 2 min 之内即可完成，而复合物在溶液中的分散状态能维持很长时间(大约 1 h)，因此对测定时间不像双缩脲方法那样严格。

考马斯亮蓝与蛋白质通过范德华力键合，在一定蛋白质浓度范围内(2～20 μg)，蛋白质的染色符合朗伯-比尔定律。此法受蛋白质的特异性影响较小，除组蛋白外，其他不同种类蛋

白质的染色强度差异不大。可以定量测定，根据OD_{595}及标准曲线可定量。

电泳鉴定蛋白质组分时，也最常用此法。有支持物时，由于支持物也会被染色，所以还需用脱色液脱色，使支持物被染的颜色退去而蛋白质与染料结合所显的颜色仍保持不退，以便观察结果，定性鉴定其纯度如何。

4. 几种有用的特异性蛋白质的显色反应

(1)坂口反应：含精氨酸的蛋白质(因为含有胍基)能与次氯酸钠(次溴酸钠)及α-萘酚在NaOH溶液中产生红色产物。该反应可用于鉴定蛋白质是否含精氨酸，也可用于定量测定精氨酸。

(2)米伦反应：含酪氨酸的蛋白质(因含有酚基)可与米伦试剂[$Hg(NO_3)_2$、$Hg(NO_2)_2$和HNO_2的混合物]反应，先生成白色沉淀，经加热沉淀变成红色。该反应可用于定性分析。

(3)黄色反应：含有芳香族氨基酸的蛋白质(特别是酪氨酸，色氨酸)与HNO_3作用生成白色沉淀，经加热沉淀变成黄色，再加碱，颜色加深呈橙黄色——这是因为芳香环(苯环)被硝化，产生黄色硝化衍生物，如皮肤、指甲和毛发等遇浓HNO_3会变黄。

(4)乙醛酸反应：含色氨酸的蛋白质与乙醛酸混合后，沿壁缓缓注入浓H_2SO_4，在两液层之间会出现紫色环，这是含有吲哚基化合物的特有反应。

(5)检出半胱氨酸和其他含巯基的化合物，是用它与硝普盐(普鲁氏盐)——$Na_2[Fe(CN)_5NO]$反应。普鲁氏盐对SH特异性显红色，可用于蛋氨酸(甲硫氨酸)的检测。

(6)甘氨酸可与邻苯二醛的乙醇溶液显墨绿色。

(7)脯氨酸对酸性吲哚醌试剂显蓝色反应。

附：凯氏定氮法

它是定量测定生物材料总氮量的一种方法。生物材料中含有许多含氮化合物，如蛋白质、核酸、氨基酸等，对其含氮量的测定在生化研究中具有一定意义，例如已知蛋白质含氮量通常为16%，因此，只要测出蛋白质样品的含氮量，再乘以6.25，即可知道蛋白质含量。又如核酸中的氮磷比值通常是一定的，如果提取的核酸样品含有蛋白质杂质，则N/P比值就增高，它是说明核酸纯度的指标之一。生物材料总氮量的测定通常采用凯氏定氮法，适用范围为0.2～2 g氮。

凯氏定氮法共分三步：消化——蒸馏——滴定。

(1)有机物(C,H,O,N,P,S)＋浓H_2SO_4、硫酸铜、硫酸钾(催化剂及提高硫酸的沸点)，反应30～60 min，产物为：

$$(NH_4)_2SO_4+CO_2+SO_3+H_3PO_4$$

催化剂：$CuSO_4/K_2SO_4=1/4(W/W)$

(2)蒸馏：$(NH_4)_2SO_4+2NaOH \xrightarrow{\text{蒸馏}} 2NH_4OH+Na_2SO_4 \rightarrow 2NH_3\uparrow+2H_2O$

收集NH_3的方法

(a)用过量标准HCl吸收蒸馏出的NH_3：$HCl+NH_3=NH_4Cl$

(b)硼酸(H_3BO_4)吸收NH_3：$NH_3+H_3BO_4=NH_4H_2BO_4$

(3)滴定

(a)标准NaOH返滴定剩余的标准HCl(甲基红为指示剂)

$$NaOH+HCl \text{——} NaCl+H_2O$$

(b)H_3BO_4吸收NH_3后,H_3BO_4溶液的H^+浓度降低,混合指示剂(5体积0.2%的溴甲酚绿乙醇溶液和1体积0.2%的甲基红乙醇溶液,pH 4.3～5.4)由黑紫色变为绿色。再用标准酸来滴定,使硼酸溶液恢复到原来的H^+浓度为止,指示剂出现淡紫红色为终点。这时所耗的HCl量即为NH_3的量,此法称为直接法,只需配制酸的标准液。

$$NH_4H_2BO_4+HCl \text{——} NH_4Cl+H_3BO_4$$

第四节　蛋白质的结构分析

蛋白质的一个突出的特征是它具有十分独特的专一的立体结构,在这种立体结构的基础上产生出蛋白质的功能。蛋白质分子具有一条或多条肽链。肽链既不是直线,也不是任意的线团,而是在三维空间上有特定的走向与排布。随着蛋白质研究的深入,立体结构的重要性越来越被人们所认识,更多的人注意到,必须同时抓住立体结构这一蛋白质的特征,才能比较清楚地了解它的各种功能的结构基础。蛋白质分子的构象又叫空间结构、高级结构、立体结构、三维构象等等,都是指蛋白质分子中所有原子在三度空间中的排布。

蛋白质分子结构可以分为一级结构、二级结构、三级结构、四级结构和五级结构。

一级结构(也叫化学结构):指蛋白质分子中氨基酸的连接方式和排列顺序。习惯上把氨基酸的N端写在左边,C端写在右边。

二级结构:指多肽链主链骨架中的若干肽段,它们各自沿着某个轴盘旋或折叠,并以氢键维系,从而形成有规则的构象,如α-螺旋,β-折叠和β-转角等(二级结构不涉及氨基酸残基的侧链构象),见图3-3。

三级结构:指的是多肽链在二级结构的基础上,由于其顺序上相隔较远的氨基酸残基侧链的相互作用而进行范围广泛的盘旋和折叠,从而产生特定的很不规则的立体结构。换句话说,三级结构指的是一条多肽链中主链及侧基所有原子的空间排布(三级结构不涉及一条肽链上的原子与另一条多肽链的原子关系),见图3-4。

在比较已知的蛋白质的三级结构的基础上,有些学者还提出了超二级结构的概念,即一些二级结构的构象单元在形成三级结构前似乎先以某种方式组合为"过渡"的结构层次,功能相似的蛋白质常有相似的超二级结构。例如,不少可和DNA结合的蛋白质中都有HTH类型的构象单元的组合(其中H代表螺旋构象,T为β转角),即这类蛋白质和DNA结合的部位都有两段螺旋,而且螺旋之间由不长的β转角相连,见图3-5。

四级结构:由两条或两条以上具有完整三级结构的多肽链聚合而成的特定构象的蛋白质分子。此多肽链就是该蛋白质分子的亚单元(亚基),由亚单元聚合而成的蛋白质分子叫寡聚蛋白质。单链的蛋白质分子没有四级结构。

有些球蛋白质分子含有一条或更多条肽链,这些多肽链彼此以共价键相连,每一条多肽链都有自己的三级结构,此多肽链就是该蛋白质分子的亚单位(亚基)。从结构上看亚单位就是蛋白质分子的最小共价单位。一个亚单位一般是由一条多肽链组成,也可以由几条多肽链

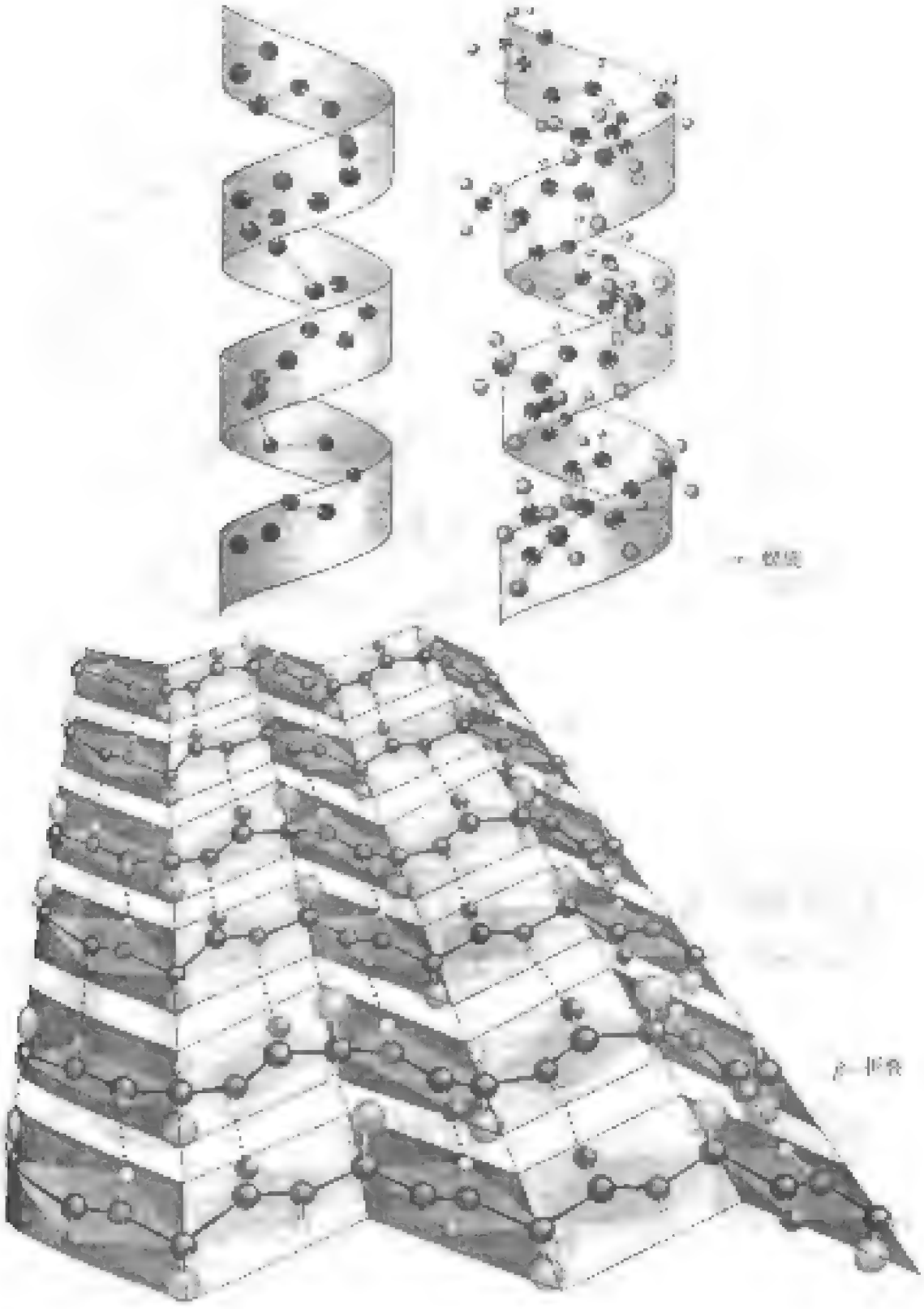


图3-3　蛋白质的二级结构

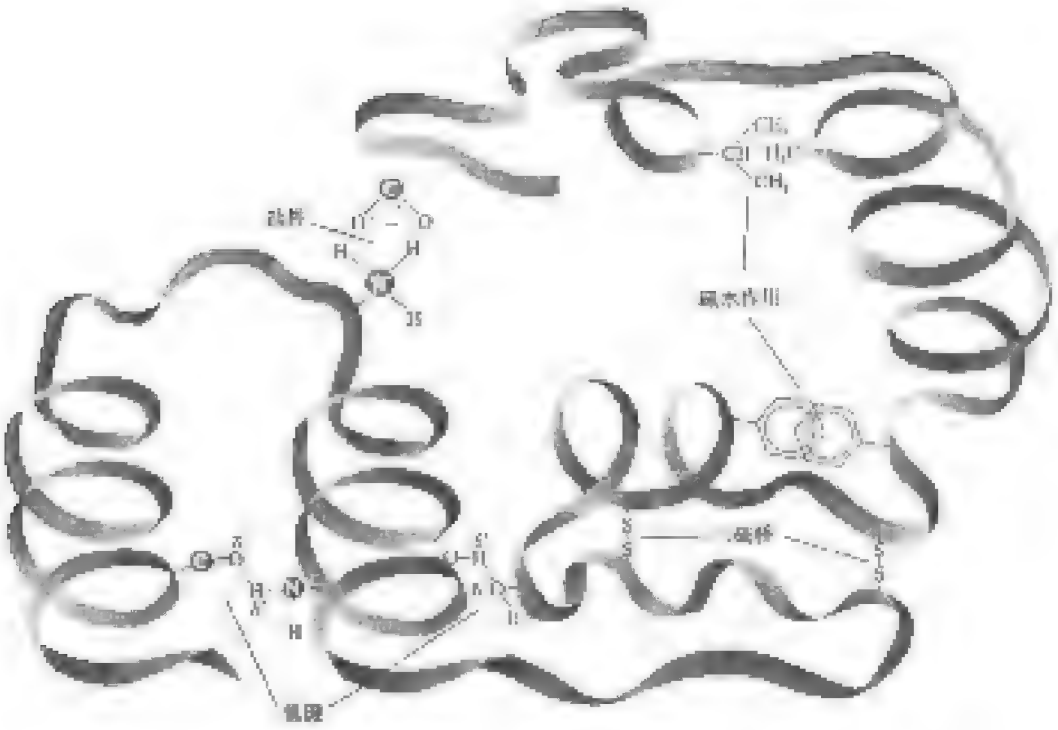


图3-4　蛋白质的三级结构

图3-5　蛋白质的超二级结构

构成，但这些多肽链必须以二硫键相连。由亚单位聚合而成的蛋白质分子叫寡聚蛋白质。所

谓四级结构就是指各个亚单位在寡聚蛋白质中的空间排布及亚单位之间的相互作用。均一四级结构由相同亚单位构成，非均一四级结构由不同亚单位构成。

亚单位之间的结合力：形成寡聚体的倾向与蛋白质中疏水氨基酸残基的含量有关，易形成四级结构的蛋白质大约有30%以上的疏水氨基酸。看来，它们不可能将这些残基全部包藏在由一条肽链折叠所形成的核心里，过剩的一些疏水氨基酸不得不暴露到与水接触的亚单位表面上。亚单位表面上的疏水侧链，为了避开水相，只有迫使亚单位聚合，以实现把剩余的疏水侧链包藏在亚单位之间的目的。由此看来，维持四级结构的主要作用力是疏水作用。但是，疏水作用并不是维持四级结构的惟一的力，氢键、范德华引力，也一定参与维持四级结构，但是它们可能仅仅起次要作用。此外，个别的情况下，离子键、二硫键等也参与维持四级结构。

五级结构：指具有四级结构的蛋白质与肽链以外的物质构成的复合物，如多酶复合体、病毒、核糖体、色蛋白等。

第五节　其他若干问题

一、构型与构象

在描写蛋白质分子空间结构方面，常用到构象与构型，这两个概念容易混淆。

构型：指的是在一个化合物分子中原子的空间排列，这种排列的改变会涉及共价键的改变（生成与破坏），但与氢键无关，如氨基酸的 D 和 L 构型。

构象：指的是多肽链中的一切原子由子单键的旋转而产生不同的空间排布。这种空间排布的变化仅涉及氢键等次级键的生成与断裂，但不涉及共价键的生成与断裂。

构型是由于化合物中的不对称性所产生的立体化学概念。它是一个不对称中心（手性碳）上几个不同的原子或基团所具有的特定的排列方式。氨基酸除甘氨酸外和单糖一样都有构型，因为多数氨基酸只有一个不对称碳原子，因此光学异构体的数目较少，而单糖的不对称碳原子较多，理论上它们的光学异构体就有 2^n 个（n 为不对称碳原子数）。

构象是另一个立体化学概念，通常和分子的不对称性无关。构象是因分子中单键旋转而导致分子中各基团或原子具有特定的相对位置。多肽链、多核苷酸链和多糖链都可以有无数不同的构象，但在天然状态，这些大分子内的某些残基间存在多种方式的相互作用，例如氢键、盐键和疏水作用等，限制了生物大分子的链的活动，因此，天然的生物大分子都有特定的空间构象——最稳定的构象，即它们的高级结构。

总之，构型来源于分子中一些不对称原子，而构象则产生子分子中一些单键的旋转。

构型是就分子中某一个不对称中心而言，构象则是对分子中不同的原子上的取代基说的。一种分子对应于一种构型，但在理论上却可以有无数种构象。在一些特定的条件下，分子以最稳定的构象出现。要改变一个化合物的构型，一定要通过化学反应，使共价键断裂和形成新的共价键，改变构象却只要旋转一些单键，而不必破坏原有的共价键和产生新的共价键。

生物大分子都有一定的空间构象，而且这些构象与生物大分子的功能密切相关。

首先，构象是有机分子因碳碳之间的单键旋转而引起的分子内各种基团或原子间的相对位置的改变，因此不同于源于手性中心所衍生出的另一种立体异构的概念——构型。蛋白质分子由成百上千个氨基酸残基组成，其中每个C—C 单键都能旋转，因此理论上蛋白质就可能出现无数种空间构象。

其次，应强调的还有两点：①蛋白质是由氨基酸残基通过肽键相连，肽键的化学实质是酰胺键。因为羧基和亚氨基的存在，使得肽键中的C—N 间的单键的长度介于C—C 单键和C=C 双键之间。因此，肽键也具有一定程度的双键性质，表现为肽键上的4个取代基和原子也有顺反异构体，以及肽键不能像单键那样任意旋转。在多数情况下，肽键上的取代基以反式存在，因为反式较为稳定。肽键不能任意地旋转，因此在进行构象研究时，常以"肽平面"为单位。②组成蛋白质的氨基酸都是α-氨基酸，氨基酸残基的氨基和羧基都是接在α-碳原子上。既然肽键不能旋转，那么由它们组成的肽链中可以旋转的也只有作为一个整体单位的肽平面和α-碳原子的各个单键。在蛋白质化学中用两个二面角(φ和ψ)来定量地描述α-碳原子上多个单键旋转的情况。

应该记住的是，在研究一级结构时，氨基酸残基被看成是一个最小单体，蛋白质的一级结构是氨基酸残基的排列顺序。而在研究蛋白质的高级结构(即空间构象)时，肽链中的最小单位是肽平面。由肽平面绕α-C 原子旋转后就产生了多种多样的蛋白质的空间构象。

在一条蛋白质的肽链中有n个残基，就有$2n-2$个可旋转的单键，因此，理论上说一个蛋白质可以有无数不同的空间构象。如果没有某种因素的存在，绝大多数的构象都是处于不断运动的状态，且多数构象是不稳定的。在蛋白质分子中有一些因素起到稳定作用。

稳定蛋白质空间构象的主要因素是蛋白质分子的众多基团间的相互作用。

氢键：肽链之间的氢键，肽键和侧链间的氢键。

静电作用：带有不同电荷的侧链间的静电的作用。

偶极作用：极性氨基酸残基侧链间的偶极作用。

疏水作用：疏水残基间的疏水作用。

配位键，还有二硫键与空间位阻等，使ψ和φ不能任意取值。

疏水作用早期提出的时候，称为疏水键。随着对疏水作用的理解和深入研究，许多人对于名词本身展开了讨论。Tanford 指出，疏水键这疏水二字实在不确切，从含义看，应准确说成是"水疏"这些基团。Hildebrand 认为，并不存在"疏水"问题，只是水对这些化合物或侧链不亲罢了。Lanffer 指出，"键"字也不准确，它的产生要比吸引力复杂的多，因此提出用"熵联"(entropyunion)一词来代替疏水键。这一词汇能否被广泛采纳，还要看发展，但它对于说明疏水作用的本质是准确的，至于"疏水键"一词，已成为化学界的笑料，逐渐地没有人用了。

如果组成蛋白质的氨基酸是β-氨基酸而不是α-氨基酸，那么肽链中可以旋转的单键还应增加一个，即α-C 原子和β-C 原子之间可以旋转，那么n个β-氨基酸构成的肽链中，可以旋转的单个肽键就有$3n-2$个，结果不仅使残基侧链所产生的位阻现象明显减小，而且使肽链有更大的可卷曲性。这样，β-氨基酸构成的肽链带来的将是另一个完全不同的世界。那些ω-氨基酸构成的肽链则是我们所熟悉的尼龙王国，这一极端可以作为一个例证。

在蛋白质分子的局部肽链卷曲后，因肽链间的氢键作用，可以使一些具有特定顺序的肽

出现有规则结构的空间构象，这就是所谓的蛋白质的二级结构。常见的二级结构有α-螺旋，β-折叠和β-转角。除了这三种有序的二级结构外，蛋白质分子还有一些所谓的无规卷曲的二级结构，但是这种无规卷曲和有机合成的高分子相比绝不是任意的，即每一种蛋白质的每一段无规卷曲也均是特定的。其中α-螺旋的结构又比其他两种β结构更有特征，在α-螺旋中每圈螺旋有3.6个残基，在肽链间形成氢键时，出现了由13个原子构成的环。如果是β-氨基酸构成的肽链，因为肽键间的距离改变以及可卷曲性增加，这些肽链是否还能形成α-螺旋和β-折叠？

具有二级结构的肽段（包括肽链的侧链）在一定程度上可以被看成是一个小的单位，它们的表面性质（例如电荷性质和疏水作用）也常是不均一或不对称的，因此，它们还能和分子中的其他部分进一步地相互作用，被称为超二级结构（三级结构）。肽链在形成固有的三级结构后，分子表面仍有一些可以和其他分子相互作用的基团。活性基团常常是分子中的活性部位，通过这些部位，蛋白质分子表现出它们的生物活性。另有些肽链，已有一定功能，但是它们还能和其他一些肽链装配成为一个功能更为完善的体系，这样的组合和结构形式是蛋白质的四级结构。

总之，蛋白质的结构是复杂而有层次的，最根本的是蛋白质的一级结构，它决定分子中的哪些肽段可以形成二级结构，它还决定了二级结构是如何地组合成为更为完善的体系。而由一级结构形成高级结构时，肽链中C—C间单键的旋转和分子内的非共价作用和二硫键是极为关键的因素，同时，蛋白质中所有氨基酸的α类型和肽键构成了不能旋转的整体性的肽平面，这两个要素对蛋白质高级结构的形成也有重要的影响。

还应指出，外界的因素也会对蛋白质的空间构象有影响，例如溶液的pH、离子强度、温度和所谓的变性剂等均能改变蛋白质的构象。

二、螺旋与生命

在奇妙的自然界里，隐藏着生命和非生命界的一个共同现象，这就是螺旋。自从最早发明螺旋式水泵的阿基米德写出第一部关子螺旋结构的科学著作以来，有关螺旋的奥秘便为人们日愈了解并加以应用。有趣的是整个生物界也都存在着螺旋现象，生命中的螺旋究竟蕴含着什么秘密呢？

1. 生命中的螺旋现象

众所周知，蛋白质、核酸及多糖等是构成生命的主要物质，这些生物大分子都存在螺旋结构。早在20世纪30年代，Astbury首次完成了蛋白质的X射线研究，发现毛发、羊毛和α-角蛋白类的某些其他纤维状蛋白质都显示了相似的X射线图谱。1950年，Pauling和Corey进一步研究并设计了最能说明图谱结果的多肽链折叠模型——α-螺旋体。现已知，不但纤维蛋白质有α-螺旋，而且球状蛋白质也有α-螺旋。

在核酸研究方面，Watson和Crick总结了前人的研究成果，于1953年提出DNA分子双螺旋结构模型，这一学说被称为分子生物学的第一原理。据他们的学说，DNA分子是右手螺旋体。在1979年，Rich等正式宣布还发现了左手螺旋DNA。至于RNA，也同样存在螺旋状结构。

关子脂质，我国学者林克椿子1982年有了杰出的发现——在生物膜中的心磷脂也能形

成双股或单股螺旋。

多糖(如直链淀粉)更是公认的螺旋状结构。

更有甚者,亚细胞甚至病毒颗粒同样具有螺旋结构,典型的例子就是Finch与Klug等发现的核小体就是由DNA分子缠绕若干组蛋白而形成螺丝管、超螺线管,最后形成染色体。又如细胞的骨架结构——微管也是螺旋状,并且凡由微管构成的细胞器如鞭毛、纤毛、中心体等均保持着螺旋结构。看来生命中的螺旋现象具有普遍性。

2. 非生命中的螺旋现象

人为的各种螺旋现象:弹簧、电风扇、螺旋桨。

1962年,美国麻省理工学院机械工程系主任谢皮罗教授及后来的英国皇家学会特别会员A·M·比尼博士等发现,位于北半球的澡盆里的水当拔去塞子后,水流出时所产生的旋涡,其旋转方向是左,在南半球则为右,而在赤道则几乎没有旋涡产生。他们把这一现象归结于地球旋转这一自然力的作用。

在浩瀚的大海里,澎湃的海水一刻也不会安静,它们在不停地环流。科学家们认为,即使是无风之日,海水也同样可形成涡流。

更使人惊讶的是,1982年2月,美国基皮克天文台的天文学家们首先观察到日面上有螺旋形的斑点。

从微观的电子到宏观的行星,它们的运动都存在着一个共同现象——螺旋运动。

3. 螺旋与生物进化

(1)生命中的螺旋现象的产生原理是否可这样理解

溶解于原始海洋中的各种有机物,受到海洋流动力学的作用而聚集在一起,在一定的温度、压力和一些无机物(如沸石、蒙脱石等)的催化下,可合成多肽和多核苷酸等大分子有机物。当这些分子链增长到一定数值时,随着海水旋转被"搓"成了螺旋结构。后者随旋涡运动可相互作用成更大的颗粒。这些颗粒通过吸附作用,集聚其他必需物质(如脂质),便可逐步形成原始生命了。

(2)蛋白质都是由*L*-氨基酸构成,是否可这样解释

假定在原始海洋中*D*/*L*-氨基酸形成多肽的机会均等,这样,海水中既有*L*-氨基酸多肽,也有*D*-氨基酸多肽,还有*D*/*L*-氨基酸混合多肽(如现知道,细胞壁中的胞壁质就会有*L*-Ala、*D*-Glu、*L*-lys和*D*-Ala组成的短肽)。但由于结构的差异,抑或说分子内能高低不等,*D*-氨基酸多肽和*D*/*L*-型氨基酸混合多肽的分子脆性大,在"搓成"螺旋状结构的过程中易断裂、分解。这样,在自然力的作用下,*D*-型氨基酸参与的多肽就难于保留下来。因此,在蛋白质分子中就找不到*D*-氨基酸了,它只能以小肽或游离多肽存在。

(3)右手螺旋与左手螺旋的存在必须遵守立体化学原则

由于多肽链中的氨基酸均为*L*-型,在左手α-螺旋中侧链β-碳原子接近羧基氧原子,能量较高,使分子不稳定,而在右手螺旋中该链自由度较大,能量较低。因此,生命中的螺旋结构,在天然状态一般以右手螺旋存在,但亦有例外。根据主链骨架旋转方向的不同,把α-螺旋分成左手α-螺旋和右手α-螺旋。如果仅看主链骨架的空间排布,左旋与右旋只是镜像关系,似乎这种差别没有什么重要意义,但是如果考虑到α-碳原子的*L*构型时,就不同了。不论是左旋还是右旋,它们都是由*L*-氨基酸残基组成的。在左旋中,β-碳原子过分接近主链骨架的羰

基氧原子，以至于构象不舒展，能量较高。而右旋没有这种缺点，它完全符合立体化学原则，因此，右旋最易形成，最稳定，存在于绝大多数蛋白质分子之中。到目前为止，仅嗜热菌蛋白酶发现一例左旋。

由于多肽链或多核苷酸链受到的力（海洋环流方向所引起的力）不同，理应有右手和左手两种螺旋体产生。现有的资料表明，自然界中的多肽链和DNA链等生物大分子物质确实有左、右两种形式的螺旋存在，只是在数量上有多有少罢了。

生命中的螺旋现象是自然力作用的结果。它遵守一条分子经济原则，这就是分子内能低者保留，高者则被淘汰。

三、β-片层结构中一个错误的延续

《生命的化学》1991年第4期第33页中报道：Arthur S. Edison指出，Linus Pauling著的《化学键的本质》一书中关于β-片层结构的模型有错误，无论是平行结构还是反平行结构都有错误，而这一错误竟通过各大专院校普遍使用的教科书得以延续30年之久。

关于β-片层结构的两个模型，用的都是*D*-氨基酸。Pauling和Corey于1951年最早提出β-片层结构的设想。与此同时，他们和Branson还设想了两种由氢键构成的螺旋结构，其中之一就是众所周知的右手α-螺旋。他们运用平面肽链、键角及键长的知识构建了一个模型，在此基础上提出了上面的几种设想。在发表的文章中，作者们讨论的都是*L*-氨基酸。在模型中虽然用的是我们现在已知的*D*-氨基酸，但作者们在当时声明，模型中R基的位置是主观推测的。1951年，这方面的研究工作刚刚开始，还不知道氨基酸的确切构型，作者们那时候提出的这些假设模型后来证明都不正确。

1955年，Pauling、Corey及Marsh发表了一篇关于丝蛋白质结构的论文，正确地描绘了*L*-氨基酸的反平行的β-片层结构。

查阅的结果表明：在Pauling及其合作者于1951年、1955年发表的文章中，关于β-片层结构的模型并没有问题。这是因为，在1951年，氨基酸的确切结构尚不清楚；在1955年，文章中的模型正确反映了已知构型的*L*-氨基酸的结构。错就错在Pauling在1960年出版《化学键的本质》第三版时，却引用了1951年论文中的模型，而那个模型中用的是*D*-氨基酸。

许多关于生物化学、生物物理学及分子生物学的教科书都引用了这个错误模型，其中包括Watson编写的《基因的分子生物学》一到四版。尤其值得怀疑的是，如果这一错误不是发生在世界著名的化学家的著作中，还会延续30年之久吗？

四、美感在科学中的作用

为什么生物体中右手螺旋结构居多？如DNA双螺旋结构、蛋白质α-螺旋结构、核糖体念珠串模型。为什么人使用右手偏多？

厦大生物系85级研究生池信才曾写过《科学美感在科学研究中的作用》。从事自然科学工作的人的美感与艺术界有所不同，他们是发自内心的和潜在的美感创造者。

科学美感在生物学研究中有重要意义。生物界存在着真和美的高度统一性，所以生物科学研究工作者具备美学、艺术素养具有特别重要的意义。

人体本身就是一种精美的艺术品，是大自然高度进化、择美的结果。在生物科学中，美感

处处可见：(1)1947年美国Olins在电镜下发现染色质成颗粒状，在颗粒之间有细头连接，因此提出了著名的染色质单位的“念珠模型”。(2)观察电镜从来就是以图像的清晰美观为准则。(3)生物间的联系纷繁多样，平衡的生态系统是一个协调、多样的世界。人们追求和谐、统一、多样的生态系统。(4)生物界还有内在无比的对称性和统一性，所有的真核细胞都是以染色体为遗传物，而且成双配对。它们的遗传密码相同、信息相同构成了生物界的统一性，而DNA复制、染色体配对、DNA螺旋等结构，说明了它们的守恒和对称性。

科学美在于发现隐含的真理以及真理的普遍适用性，在于发现自然界的和谐和简单性。科学美感是人对客观存在的科学美的反映。科学美感在科学研究中具有重要作用：(1)是科学工作者从事科研工作的重要心理因素；(2)作为科学探索的准则；(3)作为检验科学成果的一项标准。美感是科学工作者进行科学研究工作的一项重要素质，是灵感和直觉的源泉。生命有机体是大自然高度进化的产物，集中体现了大自然的美，所以生物科学工作者的美感更具有重要意义。

五、为什么大多数蛋白质分子总是采取内含疏水核外包亲水壳的球状或椭球状的紧密构象？

这是十分复杂的问题，它不仅涉及侧链之间的相互作用，而且还涉及侧链与溶剂(如溶解多肽链的水)的相互作用，此外还涉及侧链与溶剂环境(pH、温度、离子强度、溶质)的相互作用。总而言之，决定蛋白质分子二、三级结构的因素有内因和外因两方面。内因指由一级结构所决定的各种侧链之间的各种相互作用。侧链之间的相互作用在很大程度上决定了一条多肽链所采取的二、三级结构。

位于多肽链各部分的许多非极性侧链，为了避开水相，总是千方百计地聚集在一起，从而在蛋白质分子内部形成一个疏水核。由于非极性侧链之间的疏水作用，从而使多肽链盘旋折叠，形成一个紧密的球状或椭球状的三级结构。可见，非极性侧链间的疏水作用对形成和维持水溶液中的蛋白质的三级结构可能起主要作用。

带电荷的侧链基团亲水性很强，主要分布于蛋白质分子表面。如果带正电荷的侧链基团与带负电荷的侧链基团在分子表面相遇，二者便发生静电吸引，从面使多肽链形成紧密的构象。如果将溶液pH调节到蛋白质的pI的酸性或碱性一边，则蛋白质分子的净电荷增加：在酸性溶液中，蛋白质的$-COO^-$基团的负电荷被中和，结果正电荷增加；在碱性溶液中，碱性基团的正电荷被中和，结果负电荷增加。由于蛋白质分子的净电荷增加而产生的静电斥力是使蛋白质构象发生松散的主要原因，因此，在某种程度上，荷电侧链基团之间的静电引力和斥力是决定蛋白质三级结构的另一因素。

在某些蛋白质中，两条肽链或一条肽链的不同部位，其侧链基团含—SH，可以先生成二硫键，二硫键对维持蛋白质的三级结构也起一定作用。

在多肽链主链骨架上，羰基与氨基可以形成氢键，这些氢键对于α-螺旋、β-折叠和β-转角的维持起了重要的作用。没有氢键，就没有二级结构。另外，氢键对维持蛋白质三级结构亦起一定作用。

一级结构决定空间结构。一级结构的差异导致空间结构的差异，导致分子表面上基团种类数目及其准确排布的差异，从而导致功能的差异。但是也有不少不同的一级结构(氨基酸

顺序不同)产生基本相同的三级结构,例如不同来源的细胞色素C。为什么不同一级结构却能产生基本上相同的三级结构呢?这个谜现在还没有揭开。

在我们考虑蛋白质分子空间结构的时候,千万不要忘记环境因子的影响。相同的蛋白质分子,由于配体的束缚、溶液pH 的变化或者金属原子(如细胞色素C 中的Fe)价态的变化,可以导致其三级结构的变化。因此,蛋白质分子显现什么样的三级结构,一级结构固然有决定性的作用,但是环境因子也有较大影响。

六、蛋白质的立体结构是怎样形成的?

从某种意义上讲,分子生物学的研究课题可以归为三大问题:一、生命信息如何从DNA分子的核苷酸一维序列流向蛋白质多肽链的氨基酸一维序列;二、有一定氨基酸序列结构的一维多肽链如何折叠成蛋白质的三维结构;三、有一定独特三维结构的蛋白质如何发挥各种各样的生物学功能。这三个问题中目前最不清楚的应当说是第二个问题,即蛋白质的折叠问题。这个问题很长时间以来曾经纯粹是分子生物物理学中的一个理论问题。然而,由于蛋白质工程高技术的兴起,它已日益变成一个理论生物学家难啃的酸果,同时也成为使实验生物学家伤脑筋的一件事——如何保证设计的突变体多肽链仍然得以折叠成一定的立体结构?

几十年来,"蛋白质一级结构决定高级结构"的说法是分子生物学界广为接受的命题。美国科学家 Anfinson 在20 世纪60 年代关于核糖核酸酶的经典工作令人信服地证明,在离体条件下,一条一级结构完整但三维结构已被破坏的多肽链,在一定条件下可以自动地完全恢复其具有生物活性的天然立体结构。按照通常的观念,人们由此在相当长的时期内认为,蛋白质的三维结构是由一定一级结构的多肽链在一定环境条件下自发形成的能量最低态结构。从热力学角度来看,只要我们把蛋白质与其周围溶剂合在一起看做是一个体系,那么上述说法似乎应该是对的,但再仔细推敲一下,问题并非如此简单。有人从理论上估算,即便一个只由百来个氨基酸组成的肽链,如果任其无规地历尽各态,达到能量最低态其半寿期将至少是100 年,而实际上一秒钟内折叠过程即已完成。这表明,在进化过程中选择出来的氨基酸序列结构包含了可允许肽链从以天文数字计的大量可能构象中迅速找到形成具有生物活力的天然态构象的途径的信息。换句话说,折叠过程是一个动力学驱动的过程;蛋白质的天然构象不一定是能量最低态,它往往只是一个亚稳态,是一个动力学上很容易达到的亚稳态。与此相应,折叠的途径也不应该是惟一的,而是多途径的。如果某个氨基酸发生了突变,即便堵塞了相应的折叠途径,也不至于妨碍肽链按另外的途径折叠成天然构象。这是很合理的假设。试想,如果折叠途径是惟一的,任何突变都随时有可能阻断多肽链的折叠,那么生命怎么还可能起源和进化呢?已经有很多例子证明,不仅遗传学上同源的、来自不同种属的同一种蛋白质有相同的三维折叠,有些进化上不相关、一级结构并无相似性的蛋白质仍可有相似的立体结构。事实上,不仅天然突变体大量存在,近年来蛋白质工程实验和已有的实际经验也表明,只要设计合理,在多数情况下,人工突变体可以折叠成与野生型基本相同的三维结构。显然,当我们说,蛋白质立体结构是一个亚稳态,它当然是一个相当稳定的亚稳态。不过,机体也并不要求一个蛋白质绝对的稳定,相反,蛋白质分子处于经常的新陈代谢中正是活细胞的基本要求,而亚稳态是完全合适的选择。

上述关于蛋白质折叠的假设是与现有蛋白质立体结构的知识相吻合的。用X 射线晶体

学方法目前已测定了近300个蛋白质的立体结构，这300个已代表了生命体系中各式蛋白质分子的许多类型。一个惊人的事实是，所有蛋白质都可以看做是由为数有限的结构单元以有限的方式组装而成的，α-螺旋、β-折叠层这些众所周知的二级结构单位普遍存在于不同蛋白质中；近年来人们更进一步发现，二级结构片段之间的连接肽段，那些原先被称作是"无规则卷曲"的肽段的结构也只有有限的几种可能性。有人在计算机图像显示仪上用34个精确测定的蛋白质结构建了一个数据库，这34个蛋白质的5 271个氨基酸残基所采取的立体结构已包括了任何蛋白质立体结构所可能取的结构单元。换句话说，任何一个蛋白质的立体结构都可以分解为有限的几个结构片段(无非是α-螺旋、β-折叠、不同的"无规"肽段等)，每个片段的结构都可在数据库中找到基本相同的肽段结构。再进一步，这些结构单元的组装方式也是有规律的，它们按一定的层次由二级结构形成超二级结构(二级结构的组合)，再形成结构域(蛋白质结构内相对独立的三维实体)，最后形成三级结构和聚集成四级结构。组装过程大体上是在氨基酸序列中相邻的片段折叠在一起。组装的方式也是有限的，比如，凡以NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)为辅基的不同蛋白质，其结合NAD的结构域的三维折叠方式均是相同的。

现在我们来看看折叠过程到底是怎么完成的。目前比较流行的看法是，一条肽链在介质中先在局部地区通过短程相互作用(主要靠在主链之间形成氢键)形成一些二级结构区，它们可以是在最后生成的蛋白质结构中保留下来的，也可以是最后并不被保留的。它们的形成并不涉及很多能量，所以是不太稳定的。类似于一种涨落过程，它们不断地形成，又不断地消失，半衰期在微秒数量级。大体上相邻的那些二级结构片段可以通过碰撞发生相互作用。一旦某种相互作用具有立体化学特异性，而且使连接肽段处于有利的构象态，它会有较高的稳定性。这种相互作用就起到了选择作用，使恰当的二级结构被相对固定下来。在这里往往伴随疏水性侧链基团避开水相互相聚拢这样一个热力学趋向，也就是疏水效应是主要动力。这时我们可以称之为"成核"过程。在这个基础上，结构域的雏形慢慢形成，此后，结构域进一步会聚，再经过一段时间的仔细调整，直至形成天然结构。根据"扩散——碰撞"模型所做的估算，如果局部地区这种类似天然结构的微区的寿命足够长，长过相邻片段通过扩散发生的碰撞所需要的时间，又如果碰撞结果产生的结构的寿命更长了，那么一条100～200个氨基酸残基组成的肽链可以在一秒钟左右时间内折叠成形。所以上述关于蛋白质折叠的看法是合理的，也与蛋白质结构的规律一致。当然，这只是一个笼统的理论。我们仍然无法预测一定的一级结构将折叠成什么样的三维结构。正如开头所述，折叠问题的解决还有待于理论和实验工作者大量艰苦的努力。在这里特别要提一下蛋白质工程的兴起给了我们一个极其有力的手段，使我们可以仔细考察不同氨基酸人工突变对折叠过程的影响。我们相信，总有一天，人类将掌握这个"一级结构决定高级结构"的规律，从而真正实现人工设计具有新的结构和性能的蛋白质的理想。

迄今为止，人们未发现有催化折叠过程的酶，但现在却有迹象表明，存在一种能使蛋白质去折叠的酶。这种酶可能有助于使那些在折叠过程中出了差错的多肽链伸展开，重新折叠，直至形成正确的三维构象。

七、熵在生物学中的重要意义

熵是化学热力学上的一个重要概念，它在生物学中也具有重要意义，但至今尚未受到生物化学家的普遍重视。

热力学第三定律指出：对一系统和环境来说，它们总的熵值总是趋向于增加。熵，简单地说，它是无序的一种度量。无序即紊乱，一个物质系统的状态越紊乱其熵值愈高，这一系统的自由能就愈低，这一系统本身也愈稳定。世界上的万事万物都趋向紊乱，即无序和熵值增加，而要使一个系统变得有序，即熵值降低，则必须对这一系统做功，即提供能量。

下面，让我们来看看生物学中的几个例子，理解熵在生物学中的重要意义。我们的身体是一具有高度组织性(即有序性)的开放系统。事实上，生与死不过是身体的有序和无序两种状态而已。在活着的机体中，各种分子以适当的方式发生关联，精确地组成各条代谢通路，而在死亡的机体中所有分子是比较无序的。那么，我们的机体是如何维持其高度的组织性(低熵值)，我们是如何得以生存的呢？机体通过不断增加周围环境的熵来维持我们机体的低熵。例如，一个人吃进一含1 000个葡萄糖单位的淀粉大分子，这一大分子在体内完全水解可生成1 000个葡萄糖小分子，这1 000个葡萄小分子完全氧化会产生6 000个CO_2分子和6 000个H_2O分子排出体外。换句话说，机体从环境中摄取一个大分子淀粉，制造出12 000个小分子还给环境，这样，环境的熵便增加了。机体从这一过程中得到能量维持本身的有序性(低熵)。整个过程是符合热力学第三定律的。这种过程能够循环多久，机体便能存活多久，它一旦停止，死亡也就来临，这时机体处于其熵值最高的状态。

蛋白质分子的折叠现象也是说明熵的概念在生物学中有重要意义的一个例子。虽然蛋白质分子发生卷曲折叠的确切机制尚是一个谜，但据认为熵是决定蛋白质分子立体构象的主要因素之一。在伸展的蛋白质分子中，水分子(溶液环境)有规律地排布在疏水氨基酸侧链的周围，这导致水的熵值降低。为避免环境的熵值降低，蛋白质分子卷曲折叠，将疏水性侧链埋在其分子结构之中。在从伸展到折叠的过程中，蛋白质分子自身的熵值降低，即分子的立体结构更有规律(有序)，而原来排布于疏水基团周围的水分子现在散布于溶液之中，因而环境的熵值便增加了。一个分子的有序使许多个分子变得无序，这样的过程使得系统与环境的总熵升高许多，子是蛋白质分子的折叠结构比伸展结构优越。用熵的概念可以对许多生命现象进行一些解释。例如肿瘤组织和正常组织相比，前者的熵值比后者高，因为肿瘤细胞失去控制，恶性生长和分化，其正常的生物学功能降低或丧失，若控制其恶性生长和分化，降低其熵值，正常的功能便可恢复，肿瘤即被治愈。若肿瘤恶性发展至其熵值最高状态，对子肿瘤组织来说，死亡也就来临。

以上几例说明熵在生物学中的重要意义。相信随着科学的发展，越来越多的生物学工作者会逐渐熟悉和重视熵的概念。

主要参考文献

1 Trudy Mckee, James R. Mckee. 生物化学导论. 北京：科学出版社，2001

2 周润琦，陈石根，李致勋. 生物化学基础. 北京：化学工业出版社，1994

3 沈同，王镜岩，赵邦锑. 生物化学. 北京：人民教育出版社，1981

4 李建武. 生物化学. 北京:北京大学出版社,1990
5 罗纪盛,张丽萍,杨建雄. 生物化学简明教程. 北京:高等教育出版社,2001
6 鲁子贤. 蛋白质化学. 北京:科学出版社,1984
7 陶慰孙等. 蛋白质分子基础. 北京:人民教育出版社,1982
8 解用虹,郭善一. 生命的化学. SDS 辨异,1985,5(1)
9 大学化学. 第4卷第3期:蛋白质与多肽的区别在哪里,1989
10 Anna. M. Fiabane and David R. Wixliams. 黄仲贤,徐息良译. 生物无机化学原理. 上海:复旦大学出版社,1984
11 金岚. 环境生态学. 北京:高等教育出版社,2000
12 唐有祺,王夔. 化学与社会. 北京:高等教育出版社,1998

第四章　酶化学

【本章要点】

一　酶的含义、特点、分类、命名、结构

二　酶的分离与提纯

三　酶的活力测定及酶促反应动力学

四　固定化酶

五　酶的重要应用

第一节　酶的含义、特点、分类、命名、结构

一、酶的概念

生物体的基本特征之一是不断进行着新陈代谢，而新陈代谢又是由为数众多、各式各样的化学反应组成的。这些反应的一个基本的特点是它们必须在一个极温和的条件下(体温37 ℃，接近中性pH)进行。如果将这些反应与在实验室中进行的同种反应做比较，就会发现有些反应在实验室中进行需要高温、高压、强酸、强碱或其他的剧烈条件。生化反应之所以能在体内如此顺利地进行，主要原因是由于生物体内含有一类特殊的催化剂——酶。

现代酶学的开端一般认为始于Payen 和Persoz 对淀粉糖化酶(diastase)的研究。第一个酶的结晶是由Sumner 于1926 年制得的脲酶晶体。直至20 世纪30 年代才逐步形成了酶是一种特殊蛋白质的理论。

随着酶学研究的发展，在20 世纪80 年代发现了RNA，它也可作为生物催化剂。在这以前人们曾发现RAN 与蛋白质的复合物具有催化活性，但是由于受传统观念的约束，这一发现未能引起人们足够的重视。1981 年美国克罗拉多大学的Cech 研究组发现了rRNA 的自我剪切作用。随着对RNA 催化能力的深入研究，RNA 存在催化作用已不容置疑。值得注意的是，RNA 催化剂与蛋白质催化剂虽然在化学本质上有所不同，但两者具有相似的催化机制。有趣的是，到目前为止提到的RNA 催化剂(无论是天然的或是人工合成)的底物基本都是RNA，但最近见到有关RNA 单独具有分支酶的活性的报道。也就是说只有少数RNA 酶的底物不是RNA。这不仅证实RNA 催化剂的普遍存在，同时为RNA 催化剂与底物相互作用的机制研究提出了新的课题。

鉴于已知RNA 催化剂功能的单调性，即RNA 一般只催化RNA，能否这样推测：RNA

分子可能先于DNA 分子和蛋白质分子出现，它不但作为信息分子而且还兼做催化剂(RNA也是遗传物质，如某些病毒中只有RNA 与蛋白质成分)。随着生物的进化，遗传信息从不够稳定的RNA 分子转交到相对稳定的DNA 分子，同时RNA 分子亦将催化功能转交给丰富多彩、分工明确的蛋白质分子，而其自身则演化成为信息传递的中介物以及辅酶分子。这样演化的最终结果是——蛋白质催化剂普遍大量存在，而RNA 催化剂只是少数，且仅作为一种本应被淘汰却残存的功能分子(分子化石)而存在。

RNA 催化剂的发现，使得人们开始考虑修改教科书上已有的酶的定义。一种方法是将"酶是蛋白质"改为"酶是具有生物催化功能的生物大分子"，这是一种一劳永逸的做法，可包括未来可能发现的一切生物催化剂大分子；另一种方法则是保持原有的酶定义不变，而把RNA 催化剂称做Ribozym(核糖酶)，以与Enzyme(酶)区别。

二、酶的特点

酶作为生物催化剂，它具有催化剂的一般特征，也具有生物特性。

作为"催化剂"就是只需要微量存在，可以重复发挥作用，本身不被反应消耗，同时只能催化热力学上可自发进行的化学反应，减少从反应开始到达平衡所用的时间，而无法改变体系的最终平衡点，当然更无法催化热力学上不能进行的反应。

作为"生物"特性，它的来源和化学本质与一般催化剂不同：酶来源于生物细胞的合成，其化学本质是蛋白质或RNA，在生物体内不断更新；而一般催化剂是人工合成的无机物或有机物。酶的催化效率远比一般催化剂高。酶催化反应的反应速度约为一般催化剂参与反应的反应速度的10^{10}～10^{16}倍。例如，有的酶分子每秒钟可催化的底物(在酶促反应中，与酶作用的反应物)有几十万，甚至几百万个。酶还具有高度的催化特异性，一种酶只能催化种类很少的底物发生某个反应，甚至只能催化一种底物。在酶学研究中对其专一性做了如下的分类：

(1)光学专一性(optical specificity)：它是指一种酶只能催化一对镜像异构体中的一个，而对另一种异构体不起作用。如*L*-精氨酸在专一性酶的作用下分解生成了尿素和*L*-鸟氨酸。在这个反应中，底物的光学异构体*D*-精氨酸是不会被酶催化而发生反应的。

(2)几何专一性(geometrical specificity)：对于含有顺、反式结构的物质，酶只作用于其中的一种。

以上两种的专一性因与底物的立体化学关系密切，所以又统称为立体化学专一性。

(3)键的专一性(bond specificity)：酶只对某类的化学键起作用，如酯酶只能水解酯键。

(4)基团专一性(group specificity)：具有这种专一性的酶，不但对底物的化学键具有专一性，而且对键一侧的基团也有专一性的要求。这种专一性有时又称为相对专一性(relative specificity)。

(5)绝对专一性(absolute specificity)：这类酶要求底物含有的化学键及键两侧的基团都必须严格符合酶的要求，否则酶无法起到催化作用。例如脲酶具有绝对专一性，此酶对其他任何尿素衍生物都不具有催化作用。

后三种的专一性因不涉及立体化学的因素，可统称为非立体化学专一性。

酶的生物特性还体现在所作用的环境条件较一般催化剂严格，如温度、底物、离子强度、

产物浓度、介质及紫外线等大部分能够影响蛋白质性质的条件都可能导致酶的变性，从而使酶丧失催化活性。

酶的调节功能也是其生物特性的一个体现。组成代谢的生化反应大多数是在酶的催化下进行的。由于酶具有如此特殊的催化功能，而其催化活性又极易受到环境条件的影响，因而生物体就可以从多方面对酶进行调节、控制，使机体中的极其复杂的代谢有条不紊地进行。

酶不仅是生物进行代谢过程的工具，而且由于酶是生物自身产生的特殊的蛋白质，所以还可以通过改变酶的活性以控制和调节代谢过程的强度，使代谢过程得以与周围环境相协调。例如：在温带生活的人类，因以糖类为主食，造成体内参与糖类代谢过程的酶的活性较强；而生活在寒带的爱斯基摩人，由于每天随动物食品面摄入大量的脂肪，使得体内有关脂肪代谢的酶活性比较强，也不易产生酮症。由此可以看出，通过酶的调节可以实现代谢过程与环境的适应。

三、酶的命名和分类

1. 酶的命名

早期的研究中，酶的命名是由发现者决定的，所以常常由于命名的随意性导致无法体现酶的来源或是功能。现在对酶的习惯命名主要是根据以下的原则：

(1)根据酶所作用的底物命名，在酶的底物名称后加“酶”：淀粉酶、蛋白酶。

(2)根据催化反应的类型命名：水解酶、脱氢酶、转氨酶。

(3)根据酶的来源命名：尿激酶。

当然还有将两个原则结合起来的命名方法，如乳酸脱氢酶、胃蛋白酶。

在酶的命名中还有一种系统命名法，采用“底物＋反应类型＋酶”的形式，如：

$$\text{醇}+NAD^+=\text{醛(或酮)}+NADH+H^+$$

系统命名为“醇：NAD^+氧化还原酶”

习惯命名为“醇脱氢酶”

可以看出系统命名中对两底物的酶，要求将两底物都写出并在中间加“：”，而习惯命名则力求简化。

2. 酶的分类

国际酶学委员会(Enzyme Commission ，E. C)根据酶所催化的化学反应将酶划分为六大类，并再细分为亚类、组、流水号。

(1)氧化还原酶：指催化氧化还原反应的酶。这类酶还可以细分为脱氢酶、氧化酶、加氧酶、还原酶、过氧化物酶、羟基酶等。

(2)转移酶：这类酶参与了将一个官能团从一个分子向另一个分子转移的过程。被转移的官能团常有：氨基、羧基、羰基、甲基、磷酰基和酰基等。在这类酶的前面加上“转”字作为标识，如转氨酶、转甲基酶等。

(3)水解酶：水解酶催化底物的加水分解反应。水解酶包括：脂酶、磷酸脂酶、肽酶、淀粉酶、蛋白酶等。

(4)裂合酶：这类酶催化了将如H_2O、CO_2、NH_3等小分子转移走形成双键的反应或将小

分子加到双键上的逆反应，有脱羧酶、水化酶、脱水酶、脱氨酶、合成酶、醛缩酶等。

(5)异构酶：这类酶的主要作用是催化同分异构体的相互转化，即分子内的重排。差向异构酶催化手性碳原子的异构化，变位酶催化分子内官能团的转移。

(6)生合酶：又称为合成酶，连接酶。

以胰蛋白酶为例，它的分类号为(E.C. 3.4.4.4)，第一个数字"3"表示该酶为六大类的第三类——"水解酶类"；第二个数字"4"表示该酶的亚类，表示酶的水解的键的类型——"肽键"；第三个数字"4"表示该酶的组，即亚亚类；第四个数字"4"则表示该酶的具体的流水号。可以看出，酶这样的分类可以很明确地了解到酶的反应性质、反应物(底物的性质)及键的类型。

酶的国际分类系统见表4-1。

除以上讨论的分类方法，还有一些根据具体特征将酶进行分类的方法，如根据酶蛋白的分子特征来分类就可以分为：

①单体酶类(monomeric enzyme)

它由一条多肽链组成，分子量在13 000～35 000内的均属球状蛋白。

②寡聚酶类(oligomeric enzyme)

由几个甚至是几十个亚基基团组成。这些亚基可以是相同的肽链，也可以是不同的肽链，有四级结构。

③多酶复合体(multienzyme complex)

又可称做酶积体，是由活性不同但活性上有联系的多种酶通过非共价键所结合成的复合体。它具有高度的组织化结构和催化作用上的优点，即一个酶发生催化作用后的产物就立刻成了另一个酶的底物，使代谢反应不断进行下去，没有代谢中间产物释放到周围的"代谢池"中，这样就在一定程度上增加了反应物的浓度，也提高了反应的速度，并防止了分解与合成过程发生干扰。

另在文献中上还常常出现的一些名称，以下做简要介绍。

别构酶(allosteric enzyme)：这种酶除了有活性中心主要负责对底物的结合、催化外，还有一个别构中心负责与调节物结合，诱导出酶分子的某些构象，使酶活性部位对底物的结合与催化作用受到影响，从而产生调节作用。当有专一性的代谢产物出现时，别构酶就能在几秒钟内对组织或细胞的代谢变化做出反应。这种酶都是寡聚酶，即含有两个或两个以上的亚基。其分子量比单体酶大，结构更复杂，提纯困难，但有趣的是这种酶在零度以下反而不稳定，在室温下或体温下稳定。其特征主要是初速度与底物浓度不符合米氏方程，见图4-1。

在别构酶与底物的相互作用过程中，调节物或称效应物与酶分子中的别构中心结合后诱导或稳定了酶的某种构象，使酶活性中心对底物的结合与催化作用受到影响，从而调节酶的反应速度及代谢速度，此效应称为"别构效应"。别构效应根据其调节物的不同可以分为：

"同促作用"(homotropic effect)——调节物就是底物分子。

"异促作用"(heteotropic effect)——调节物不是底物分子。

"同促——异促效应"是既受底物调节，又受其他代谢产物调节的别构效应。

共价调节酶：可由其他酶对其结构进行共价修饰而使其在活性形式与非活性形式之间相互转变。另外共价调节酶可以将化学信号极大地放大，即一个酶分子可以在一定时间内催

表4-1 酶的国际分类系统——大类、亚类和某些亚亚类

大类	亚类	亚亚类	举例		
			酶名	涉及物质	反应
1. 氧化还原酶类：催化H、O原子或电子从一底物向另一底物转移的反应	1. 作用于>CHOH 2. 作用于>C=O 3. 作用于 HC=CH 4. 作用于>CH—NH_2 5. 作用于 —CH—NH 6. 作用于NADH，NADPH 7. 作用于其他含氮基团 8. 作用于含硫基团 9. 作用于血红素基 ⋮	1. NAD^+或$NADP^+$ 2. Fe^{3+}（如细胞色素） 3. O_2 ⋮	醇脱氢酶 (ADH，1.1.1.1) 乳酸脱氢酶 (LDH，1.1.1.27) 葡萄糖6-磷酸脱氢酶 (G-6-P DH，1.1.1.49) 琥珀酸脱氢酶 (SDH，1.3.99.1) 谷氨酸脱氢酶 (NAD^+，1.4.1.2) 谷氨酸脱氢酶 ($NADP^+$，1.4.1.3)	NAD^+ NAD^+ $NADP^+$ FAD NAD^+ $NADP^+$	醇+NAD^+⇌醛或酮+NADH(H^+) *L*-乳酸+NAD^+⇌丙酮酸+NADH(H^+) 葡萄糖6-磷酸+$NADP^+$⇌*D*-葡萄糖酸内酯6-P+NADPH(H^+) 琥珀酸+FAD⇌延胡索酸+$FADH_2$ *L*-谷氨酸+H_2O+NAD^+⇌α-酮戊二酸+NADH(H^+) *L*-谷氨酸+H_2O+$NADP^+$⇌α-酮戊二酸+NADP(H^+)
2. 转移酶类：催化两分子间一个原子或基团转移，即$AX+B \rightleftharpoons BX+A$类型反应，排除类似的氧化还原酶和水解酶反应	1. 转移一碳基团…… 2. 转移醛基或酮基 3. 转移酰基 4. 转移糖苷基…… 5. 转移甲基外烃基 6. 转移含氮基团 7. 转移含磷基团…… 8. 转移含硫基团	1. 甲基 2. 羟甲基 3. 羧基转移 1. 己糖基 2. 戊糖基转移 1. 醇基 2. 羧基 3. 含氮基团作为磷酸受体	谷草转氨酶 (GOT，2.6.1.1) 谷丙转氨酶 (GPT，2.6.1.2) 己糖激酶 (2.7.1.1) 葡萄糖激酶 (2.7.1.2) 肌酸激酶 (CK，2.7.3.2) 磷酸葡萄糖变位酶 (2.7.5.1)	磷酸吡哆醛 磷酸吡哆胺 磷酸吡哆醛 磷酸吡哆胺 ATP ATP ATP	*L*-谷氨酸+草酰乙酸⇌*L*-天冬氨酸+α-酮戊二酸 *L*-谷氨酸+丙酮酸⇌*L*-丙氨酸+α-酮戊二酸 *D*-己糖+ATP⇌*D*-己糖-6-P+ADP *D*-葡萄糖+ATP⇌*D*-葡萄糖-6-P+ADP 肌酸+ATP⇌磷酸肌酸+ADP α-*D*-葡萄糖1-P⇌α-*D*-葡萄糖-6-P

续表

大类	亚类	亚亚类	举例：酶名	举例：涉及物质	举例：反应
3. 水解酶类：催化 $AX+H_2O \rightleftharpoons X-OH+HA$ 形式的水解反应	1. 作用于酯键…… 2. 作用于糖苷键 3. 作用于醚键 4. 作用于肽键 5. 作用于肽键外C—N键 6. 作用于酸酐键 7. 作用于C—C键 8. 作用于卤化键 9. 作用于P—N键	1. 羧基酯 2. 硫醇酯 3. 磷酸酯水解	碱性磷酸酶 (3.1.3.1)	H_2O	磷酸单酯$+H_2O \rightleftharpoons$醇+磷酸
			酸性磷酸酶 (3.1.3.2)	H_2O	磷酸单酯$+H_2O \rightleftharpoons$醇+磷酸
			5′-核苷酸酶 (3.1.3.5)	H_2O	5′-核苷酸$+H_2O \rightleftharpoons$核苷+磷酸
			α-淀粉酶 (3.2.1.1)	H_2O	内部水解多糖中α-1,4-糖苷键
			β-淀粉酶 (3.2.1.2)	H_2O	水解多糖α-1,4-糖苷键，从链非还原末端连续移去麦芽糖单位
			氨肽酶 (3.4.11.1)	H_2O	氨酰基肽$+H_2O \rightleftharpoons$氨基酸+肽
			羧肽酶A和B (3.4.17.1—2)	H_2O	肽酰基-*L*-氨基酸*$+H_2O \rightleftharpoons$肽+*L*-氨基酸(此例中，酶A为中性氨基酸，酶B为碱性氨基酸)
			精氨酸酶 (3.5.3.1)	H_2O	*L*-精氨酸$+H_2O \rightleftharpoons$ *L*-鸟氨酸
4. 裂合酶类：催化从底物移去某些基团的非水解性反应，常留下双键	被破坏的键： 1. C—C 2. C—O 3. C—N 4. C—S 5. C—X* (*指卤族元素) ⋮ ⋮	被移去基团： 1. 羧基(即CO_2) 2. 醛基 $(-\mathrm{C}(\mathrm{H})=\mathrm{O})$ 3. 酮酸基 $(-\mathrm{C}(=\mathrm{O})-\mathrm{COO}^-)$	异柠檬酸裂合酶 (4.1.3.1)		异柠檬酸$\rightleftharpoons$琥珀酸+乙醛酸
			柠檬酸合酶 (4.1.3.7)		乙酰CoA+草酰乙酸$+H_2O \rightleftharpoons$柠檬酸+HSCoA
			烯醇化酶 (4.2.1.11)		甘油酸-2-P$\rightleftharpoons$磷酸烯醇式丙酮酸$+H_2O$
			精氨酸琥珀酸裂合酶 (4.3.2.1)		*L*-精氨酸琥珀酸$\rightleftharpoons$ *L*-精氨酸+延胡索酸
			腺苷酸环化酶 (4.6.1.1)		ATP$\rightleftharpoons$3′,5′-cAMP+焦磷酸

续表

大　类	亚　类	亚亚类	举　例		
			酶　名	涉及物质	反　应
5. 异构酶类：催化同分异构反应	1. 消旋及差向异构酶 2. 顺反异构酶 3. 分子内氧化还原酶 4. 分子内转移酶 5. 分子内裂合酶	1. 氨基酸 2. 羟酸 3. 糖	UDP-葡萄糖 4-差向酶 (5.1.3.2) 醛糖-1-差向酶 (5.1.3.3) 木糖异构酶 (5.3.1.5) 磷酸葡萄糖异构酶 (5.3.1.9)		UDP 葡萄糖⇌UDP 半乳糖 *α*-*D*-葡萄糖⇌*β*-*D*-葡萄糖 *D*-木糖⇌*D*-木酮糖 *D*-葡萄糖-6-P⇌*D*-果糖-6-P
6. 连接酶类：催化与 ATP 或其他三磷酸核苷破裂相偶联的新键形成反应 $X+Y+ATP \rightleftharpoons X-Y+ADP+P_i$ $X+Y+ATP \rightleftharpoons X-Y+AMP+PP_i$	生成新键： 1. C—O 2. C—S 3. C—N…… 4. C—C	1. 酸·氨 2. 酸·氨基酸	氨酰-tRNA 合成酶 脂酰 CoA 合成酶 (6.2.1.3) 精氨酸琥珀酸合成酶 (6.3.4.5) 氨甲酰磷酸合成酶 (6.3.4.16) 乙酰 CoA 羧化酶 (6.4.1.2)		*L*-氨基酸＋ATP＋$tRNA^{AA}$⇌*L*-氨酰-$tRNA^{AA}$＋AMP＋焦磷酸 脂肪酸＋ATP＋HSCoA⇌脂酰 CoA＋AMP＋焦磷酸 *L*-瓜氨酸＋*L*-天冬氨酸＋ATP⇌精氨酸琥珀酸＋AMP＋焦磷酸 2ATP＋NH_3＋CO_2＋H_2O⇌氨甲酰磷酸＋2ADP＋磷酸 乙酰 CoA＋ATP＋CO_2＋H_2O⇌丙二酰 CoA＋ADP＋磷酸

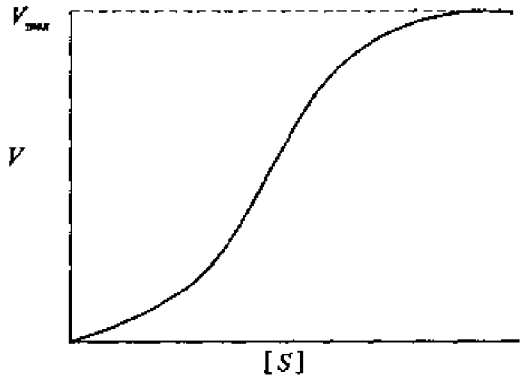


图 4-1 [S]:反应物浓度 V:反应速度

化形成几千个分子产物。

同工酶(isoenzyme):指能催化同一种化学反应但其酶蛋白本身的分子结构组成有所不同的一组酶。目前已经发现数十种同工酶。在同工酶中,又依据其是否由基因编码决定而分为:

①原级同工酶:由在染色体上不同位点的基因所编码或不同个体的等位基因不同而形成的酶蛋白。

②次级同工酶:酶蛋白的翻译产物经过不同的修饰而具有不同的分子形式,又称为翻译后同工酶。

同工酶可能是有机体对环境变化或是代谢变化的一种调节方式,甚至可能是生物体不断进化的一个体现。当一种同工酶受到抑制或破坏,其他的同工酶仍然能够起作用,从而保证代谢的正常进行。同工酶分析法在农业上已开始用于优势杂交组合的预测,而在医学上依据病人及正常人的同工酶电泳图谱进行比较有助于疾病的诊断。

结构酶(structural enzyme)、诱导酶(induce enzyme):结构酶,指细胞中天然存在的酶,它的含量较为稳定,受外界影响很小。诱导酶,指当细胞培养液中加入诱导物质后产生的酶,它的含量在诱导物存在下显著提高,这种诱导物往往是该酶底物的类似物或就是底物本身。诱导酶常见于微生物中。

四、酶的化学组成与结构

酶的化学本质是蛋白质(除少数的RNA 酶),和一般的蛋白质一样,酶蛋白的组成也是由氨基酸以肽键相连接形成,同样具有一级、二级、三级、四级结构。

对于酶的催化功能最重要的就是酶的活性中心(active center),它是指与酶活力的显示有关的区域。它是由酶蛋白中氨基酸残基的侧链或肽链末端的氨基和羧基依靠酶分子中的二级和三级结构而形成的,通过肽链的折叠,在酶分子的表面形成一个具有特定三维结构的区域。为了体现该区域具有一定的空间体积,也称其为"活性部位"(active site)。

1. 残基分类

对于肽链中的氨基酸的残基及侧链基团,根据其在酶活力呈现中的作用,将残基分为四类。

(1)接触残基(contact residues):指与底物直接接触并参与底物的转变的残基,它是活性中心中最重要的组成部分。

(2)辅助残基(auxiliary residues):此类残基不直接与底物接触,其作用是促使酶与底物的结合并辅助接触残基发挥作用。它在酶的活性表现上也是一个不可缺少的组成部分。

(3)结构残基(structure residues):此类残基虽然离开底物分子较远,不在酶的活性中心范围之内,但是由于它在维持酶分子的空间构象方面起着重要的作用,也是酶分子的必须残基。若此类残基位置发生大的改变,会使酶的活性丧失。

由于以上三种残基对于酶分子的活性的存在是必不可少的,所以又被称为必须残基。

(4)非贡献残基(non-contributing residues):这类残基不参与酶的催化功能,它们的存在对酶的活性不起作用,所以又称为非必须残基。这类残基在酶分子中占有很大的比例。

综上所述,可以看出酶的催化作用只是发生在酶分子上的一个小的区域——通常称之为活性部位或是活性中心,并且活性部位上起作用的基团并不是由一级结构上相邻近的氨基酸残基形成的,而是由酶的二、三级结构所形成的,所以没有酶的二、三级结构就不可能构成有效的活性部位。参与酶活性中心形成的各种残基的空间构象对于酶的活力的表现是至关重要的,而维持这一构象的稳定又依赖于酶的二、三级结构的完整,丧失了二、三级或更高级结构的酶,其活性会下降甚至失活、变性。对于活性部位,只是为了讨论酶的作用机制方便才把它们独立起来,实际上它是和整个酶分子分不开的。酶的其他部位对于催化作用、调节作用、免疫作用、维持一定的空间结构等方面都有很重要的作用,所以认为酶除了活性中心以外其他部分可有可无是错误的。

辅助因子:在酶分子中还有一些酶蛋白以外的部分,但是它又是酶表现完全活力所必须的部分,可称为辅助因子。这类物质可能是与酶蛋白结合或松或紧的有机物质,也可能是一种金属离子。对于辅助因子而言,酶的纯蛋白质部分可称为酶蛋白。这类酶蛋白只有当辅助因子与酶蛋白结合成全酶时,才能显示酶的活力。

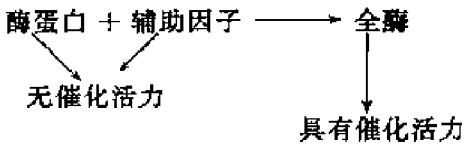


图4-2 部分全酶的组成

2. 辅助因子

辅助因子可分为有机辅因子和金属辅因子。

一般来说,对酶活力的显示是必须的而且可以从反应混合物中完整地分离出来的非蛋白质物质被称为酶的辅助因子。它由三类物质组成:辅酶、辅基和必须离子。

(1)辅酶:在酶促反应过程中,起着运载底物的电子或某类基团的作用。在这个反应中,它虽然发生了变化,但是通过其他酶或其他反应,可以重新恢复到原来的状态。辅酶运载底物电子或在反应后离开酶的活性部位成为另一个酶的底物,通过其他反应再生成原来的形式,也称为辅底物、辅酶。一般地说,辅酶是指那些为酶的催化活力的显示所必须的有机小分子。

(2)辅基:辅基在酶反应过程中,一直结合在酶的活性部位,成为活性部位的一个部分,在它们再生为原来的形式时也不离开原来的酶的活性部位。

区别辅酶与辅基可采用透析的方式。辅酶可以被透析出半透膜,而辅基却无法被透出。由此可以看出,与辅基相比,辅酶与酶蛋白的结合是疏松的。在生物化学中,通常也把辅基包括在广义的辅酶中。

有时,我们又将与酶的功能直接相关的一些无机的或是分子量不大的有机成分统称为辅因子。

(3)金属离子:不仅在金属酶类中存在,还存在于能被金属离子激活的酶中。虽然这两类酶对金属离子的亲和力有一定的差别,但是失去了金属离子后都会丧失酶的活力。对于金属酶中的金属离子,不认为是酶的激活剂,如细胞色素C就是一种金属酶,用一般的方法是无法将其所含的铁分离出来的。另一些被金属激活的酶在提纯后往往不含有金属。需要注意的是,虽然金属离子常能够提高酶的活力,但需将离子的浓度控制在一定的范围内,通常在10^{-4}~10^{-3} mol/L,若离子浓度过大,对酶有抑制作用.

(4)维生素:维生素是生物正常生长代谢必须的微量有机物质。人和高等动物一般不能合成维生素。长期以来,人们根据生物中若缺乏维生素会导致某些疾病的现象推测维生素必定在有机体的新陈代谢中发挥着某种关键作用。第一个被分离到的维生素是维生素B_1(硫胺,thiamine),人体内缺乏该物质会导致丙酮酸氧化脱羧过程受阻,引起多发性神经炎、皮肤麻木、心力衰竭、四肢无力、肌肉萎缩、下肢浮肿等症状;还有如维生素C——抗坏血酸、B_{12}(氰钴胺素)等也都对人体有极其重要的作用。很多维生素与某些酶的辅因子有对应关系,见表4-2。

表4-2 辅酶或辅基与维生素的关系

酶大类	辅酶或辅基	维生素
1. 氧化还原酶	吡啶核苷酸类(NAD^+、$NADP^+$)	维生素PP(菸酸、菸酰胺)
	黄素类(FAD、FMN)	维生素B_2(核黄素)
	苯醌类(辅酶Q)	——
	血红素类	——
	谷胱甘肽	——
2. 转移酶	硫受素焦磷酸(TPP)	维生素B_1(硫胺素)
	辅酶A	泛　酸
	生物素	维生素H(生物素)
	硫辛酸	——
	磷酸吡哆醛	维生素B_6(吡哆醇等)
	四氢叶酸	叶　酸
	甲基钴胺素	维生素B_{12}
3. 水解酶	——	——
4. 裂合酶*	硫胺素焦磷酸	维生素B_1(硫胺素)
5. 异构酶+	钴胺辅酶	维生素B_{12}
6. 连接酶	——	——

第二节　酶的分离与提纯

生物大分子结构与功能的研究已成为探索生命奥秘的焦点，也是生物科学以至整个自然科学界具有重大理论意义和实践意义的课题。生物大分子结构和功能的研究必须首先解决生物大分子的制备问题。没有高纯度的生物大分子的制备工作为前提，结构与功能的研究也就无从谈起。生物大分子的制备是一件十分精细的工作，需要付出长期艰辛的努力。制备工作涉及物理学、化学和生物学的知识。提纯某一生物大分子一般要通过多种方法、步骤和不断变化各种外界条件才能达到目的。

无论何种方法，在何种阶段都必须注意在操作中要保持生物大分子的结构的完整性，防止变性及降解的现象出现。酶的纯化是属于蛋白质纯化的范围，所以对蛋白质的纯化方法也同样适用于酶。

酶的分离纯化有下述3个特点：

(1)在尽可能除去酶以外的杂质的同时要保证"目的酶"在纯化过程中不被破坏。

(2)在分离纯化过程中检测酶的活性(比活力、总活力)。在酶的分离提纯过程中不但要把酶制剂从很大体积浓缩到比较小的体积，还需要把酶制剂中大量的杂质蛋白质和其他大分子物质分离出去。因此，在实际操作中评价分离提纯方法的优劣，一般采用两个指标：总活力的回收率、比活力的提高倍数。一个好的提纯步骤应该是总活力回收较大，比活力提高的倍数也较大。在实际操作中两者往往不可兼顾，因此在设计新的提纯方法时，要根据材料是否容易得到、提纯进行的不同阶段等情况进行取舍。

(3)分离纯化分为三个基本环节：抽提、纯化、制剂。首先将原料中的酶提出来，然后将酶与其他杂质选择性地分开，最后制剂，即将纯化的酶做成一定形式的制剂。

生物大分子的分离过程一般可分为5个阶段：

(1)选材：一种酶含量丰富的器官或组织往往和酶含量较低的器官或组织相差上千倍甚至上万倍，所以在选取材料时要考虑材料的酶含量。在这个条件的基础上还要考虑其他的因素，以从微生物中提取酶为例，就必须考虑微生物的年龄、培养季节、培养条件等因素的作用。

(2)细胞的破碎：提取酶的材料通常为动物的器官，植物或是微生物细胞。动物细胞较容易破碎。植物和微生物细胞的细胞壁较厚，要采用超声波、细菌磨、溶菌酶、某些化学溶剂(次氯酸、氨水、甲苯等)、高速组织捣碎机等才能破碎。这个步骤最后得到的将是组织匀浆液。

(3)抽提：一般在低温条件下，采用水或者是低盐的缓冲液来提取，以从组织匀浆中得到粗酶液。在这个步骤中要采用少量多次的原则。

(4)初步提纯

酶的初步提纯一般是指利用酶的以下几种性质将之与其他物质初步分离开。

利用酶蛋白性质的差异来初步提纯的方法有：采用核酸沉淀剂如$MnCl_2$、链霉素等；蛋白质沉淀剂如$Pb(Ac)_2$等；能使部分蛋白质变性的药品；调节溶液的pH或加热溶液使之沉淀；利用不同的蛋白质的等电点；加入某些选择变性剂或蛋白质表面变性等方法。

沉淀的方法：电荷密度的控制，如加入盐沉淀的方法（盐析）。盐析是目前用途比较广泛的一种方法，常用的盐为$(NH_4)_2SO_4$和NaCl，特别是前者，因为它的溶解度比较大，对大部分的酶是无害的，容易得到纯的试剂。在浓度较高时，$(NH_4)_2SO_4$往往对一些酶具有稳定作用，所以盐析绝大多数都用$(NH_4)_2SO_4$。表示$(NH_4)_2SO_4$浓度的方法习惯上用其饱和度的百分数，并且根据不同的浓度还可以分级沉淀出不同的蛋白质。在实验中从一定饱和度要达到另一个饱和度每100 ml溶液要加多少克固体$(NH_4)_2SO_4$可以查表得到。在采用这个方法沉淀时要注意加入固体的速度。

在初提中还有一种吸附分离的方法，它曾是最主要的和最成功的酶的分离方法。现在随着其他分离方法的发展，吸附分离法的应用没有以往那么普遍了，但仍有它的重要性。它是利用不同的条件，把需要的酶吸附在吸附剂上，然后把它洗脱下来，或者利用酶不被吸附的条件把大量的蛋白质杂质吸附。常见的吸附剂有磷酸钙凝胶、氧化铝、氢氧化锌等，有时也用活性炭来吸附不需要的成分。

还可以采用以有机沉淀剂沉淀的方法。常见的有机沉淀剂有利凡诺、单宁酸、SDS等。有机溶剂沉淀法是一种比较经典但也是比较有效的方法，虽然使用不当会使酶失活，但如果使用得当就具有了快速、无须特殊设备的优点。常用的有机溶剂有乙醇、丙酮和甲醇等。该方法的整个步骤要求在低温下进行（−5～−10 ℃）。聚乙二醇等水溶性非离子型高聚物是常用的沉淀剂，高浓度的聚乙二醇会使低分子量的和分子体积小的酶沉淀下来，低分子量的聚乙二醇会使高分子量的和分子体积大的酶沉淀下来。

(5)酶的精制

①层析：分步层析、吸附层析、离子交换层析、亲和层析。

分步层析包括纸上层析法和柱上层析法，吸附层析中也有纸上层析和薄层层析。柱层析已经成为一种常规的分离酶的方法。柱层析的操作主要包括以下步骤：

a. 离子交换剂/凝胶/吸附剂的预处理

b. 装柱、平衡

c. 上样品、洗脱、分步收集

d. 对洗脱的各部分进行酶活力的测定

亲和层析是近年来发展起来的一种极为有效的提纯方法，它主要是利用酶和底物、抑制剂或者是辅酶具有一定的结合能力这一性质来提纯和分离酶。

首先选择一种支持物，如琼脂糖或具有其他功能基团的载体，把竞争性抑制剂或是辅酶以共价键的方法连接在支持物上，然后使含酶的抽提液流经装有含竞争性抑制剂或是辅酶的层析柱，酶即保留在支持物上，经过充分洗涤后，再用含有一定浓度的底物或竞争性抑制剂或辅酶的缓冲液竞争洗脱。

这一分离方法已经成功地用于凝血系统的一些酶的分离。如果亲和剂选择得当，有时经过亲和层析一步就可以达到要求的纯度。这一方法现在已经成为酶的分离纯化中最为方便和最有效的方法之一。从发展前景来看，它很可能会在今后一段时间内发展成为酶的分离纯化的最主要的方法。

还有凝胶过滤法，其过程中的步骤分为：介质Sephadex准备、柱准备、装柱、平衡、上样、洗脱、再生和保存。

②超离心法：这种方法包括沉降速度法、沉降平衡法。沉降速度法中还包括差速离心法、速度－区带离心；沉降平衡法包括等密度离心法和平衡密度离心法。

③电泳法：包括凝胶电泳、等电聚焦和纸上电泳。等电聚焦是在一个垂直的柱子中产生的一个防止对流扩散的蔗糖的密度梯度溶液，在此溶液中同时含有两性电解质载体。在电场的作用下，溶液中产生的天然pH梯度被具有不同等电点的两性电解质稳定下来，被分离的酶在溶液中按其电荷的性质向不同的方向迁移，当它迁移到某一个与它的等电点相同的pH位置时，便不再移动，停留在这一位置，产生了聚焦的效应。

在提纯过程中酶活力的测定是用来检测酶的去向的，可以用反应物的减少量与反应时间之比或产物的生成量与反应时间之比来表示。活力测定的工作量在酶的分离过程中往往是相当大的，同时也需要能够较快地取得结果，因此在选择测定方法时，为了适应提纯上的需要，往往选择一个准确性稍差但比较方便、快速的方法，而不要选择一个准确性较高但操作麻烦、费时的方法。常见的酶的活力的测定方法有：分光光度法、旋光法、荧光法、化学反应法、同位素法、量热法、层析法、电化学方法等。一些常见的根据被分离物质性质分离的方法见表4-3。

表4-3　根据物质性质而采用的分离方法

性　质	具体方法
分子大小和形状	差速离心、超滤、分子筛、透析
溶解度	盐析、溶剂抽提、分配层析、逆流分配、结晶
电荷差异	电泳、电渗析、等电点沉淀、离子交换层析、吸附层析
生物功能专一性	亲和层析

以上介绍的一些酶的分离纯化的方法是很不全面的，还有一些其他的方法，例如高压液相层析，目前它已经成为分离鉴定分子较小的多肽激素和生物高分子的很重要的方法。

另外，上述这些分离方法如何联合起来使用也是很重要的。以前往往用硫铵盐析作为分离提纯的起始步骤，但近年来许多工作表明，用这种方法提纯的酶往往不是天然的状态，可能是蛋白水解酶所致。可以考虑在原来的步骤上加入蛋白水解酶的抑制剂，或是考虑用亲和层析作为提纯的第一步，那就可以除去大量的杂质，使体积大大地缩小，同时也避免了蛋白质水解酶的副作用。如果酶比较稳定，有时可以用热处理方法作为第一步，以除去大量的杂蛋白。

第三节　酶活力测定及酶促反应动力学

一、米氏方程

1902年，Henri在研究中发现酶促反应中：在低浓度底物的条件下，反应速度v随着底物浓度的增加而直线上升；在高浓度底物条件下，反应速度v只有小幅度的上升甚至没有变化。

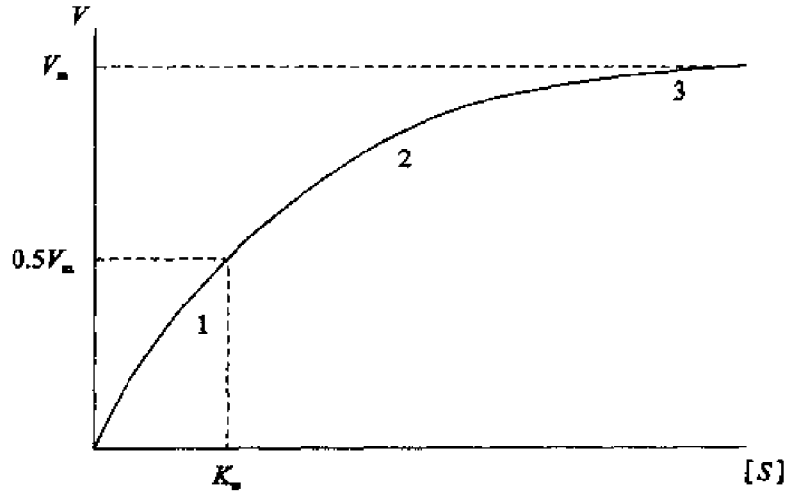


图4-3　底物浓度与酶反应速度的关系

基于这些实验现象，Henri提出了“酶—底物中间复合体”的假说，在现在的研究中发现这一假说得到了较多的实验现象的支持。该假说的基本表示如下：

$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_0} E+P$$

图4-4　酶—底物中间复合体

E：酶　S：底物　ES：酶—底物复合物（活性中间产物）　P：产物

在处理过程中采用了稳态处理的方法，认为在反应开始时底物较酶远远过量；产物由于浓度很低对活性中间产物的分解无抑制，且开始反应后，ES的浓度很快就保持不变，为一个定值。由此可得：$[S]\gg[E]$、$[E_0]>=[ES]$、$[S]-[ES]=[S]$

在这些条件的基础上可以推导出著名的米氏方程如下（对于酶动力学的推导还可以采用矩阵、图像等方法，可参阅相关书籍）：

$$V=V_{max}\times[S]/(K_m+[S])$$

其中V_{max}是酶对于特定底物的反应初速度，由于此时的底物浓度最大，所以酶促反应的速度也是最大的；K_m在数值上等于$(k_{-1}+k_0)/k_1=[E][S]/[ES]$，称为米氏常数，在酶的动力学

上有极其重要的意义。

(1)K_m 作为酶的一个特征常数，对于特定的反应和特定的反应条件有特定的值。值得注意的是，纯化程度不同的酶，只要其杂质中不含有能与底物发生作用的成分，那么其 K_m 基本相同。表4-4 为某些酶的 K_m，其数值一般在10^{-2}～10^{-6}的数量级范围内。特别要注意的是米氏常数的量纲与浓度量纲相同。

(2)从米氏方程中可以看出$K_m=(k_{-1}+k_0)/k_1$，当$k_{-1}\gg k_0$ 时，$k_m=k_{-1}/k_1$，在某些资料中又将其称为k_s。这是活性中间产物 ES 的解离常数。因此，K_m 越大，则络合物越容易解离，也就说明酶与底物的亲和力越小。由米氏常数还可以看出：当$[S]=K_m$ 时，$V=\frac{1}{2}V_{max}$，可认为此时酶的活性中有一半为底物所占据，并发挥了催化作用；若$K_m\ll[S]$，则此时的酶总是处于被底物占据的状态，反应速度的制约因素是酶的浓度；若$K_m\gg[S]$，则此时的酶处于未被饱和的阶段，底物浓度是影响反应速度的最主要的因素。若已知某个酶的K_m，又知道底物浓度时，就可以计算出反应速度与V_{max}的值。在实际操作中，为了使反应的初速度基本接近于V_{max}，且过量底物不至于抑制酶的活性，通常将底物的浓度设定在K_m 的10 倍以上。

表4-4　某些酶的 K_m 值

酶	底　物	K_m(mol/L)
胰凝乳蛋白酶	N-苯甲酰酪氨酰胺	2.5×10^{-3}
	N-甲酰酪氨酰胺	1.2×10^{-2}
	N-乙酰酪氨酰胺	3.2×10^{-2}
β-半乳糖苷酶	乳糖	4×10^{-3}
苏氨酸脱氨酶	苏氨酸	5×10^{-3}
碳酸酐酶	CO_2	8×10^{-3}
青霉素酶	苄基青霉素	5×10^{-5}
过氧化氢酶	H_2O_2	2.5×10^{-2}
己糖激酶	葡萄糖	1.5×10^{-4}
	果糖	1.5×10^{-3}
谷氨酸脱氢酶	谷氨酸	1.2×10^{-4}
	α-酮戊二酸	2.0×10^{-3}
	NH_4^+	5.7×10^{-2}
	NAD^+	2.5×10^{-5}
	NADH	1.8×10^{-5}
丙酮酸羧化酶	丙酮酸	4×10^{-4}
	HCO_3^-	1×10^{-3}
	ATP	6×10^{-5}
精氨酸 tRNA 合成酶	精氨酸	3×10^{-6}
	tRNA	4×10^{-7}
	ATP	3×10^{-4}

(3)当一系列的酶催化一个代谢过程的连锁反应时，若能确定各种酶的 K_m 及相应的底

物浓度，就有助于确定代谢过程的控制步骤。如已知三种酶 Ea、Eb、Ec 的 K_m 分别为 10^{-2} mol/L、10^{-3} mol/L、10^{-4} mol/L，底物浓度都是 10^{-4} mol/L，反应如下：

$$A \xrightarrow{Ea} B \xrightarrow{Eb} C \xrightarrow{Ec} D$$

图 4-5　连锁反应

则可判定A→B是这个代谢过程的限制步骤。通过判断K_m的大小还可以判定出酶的最适底物。根据同工酶对同一底物的 K_m 是否相同可区别原级同工酶和次级同工酶，还可根据 K_m 的变化，判断酶的抑制是竞争性抑制还是非竞争性抑制。

K_m 的求取：K_m 既然是酶分子的重要的特征性参数，下面介绍常见的求取 K_m 的方法——Lineweaver-Burk 作图法。

将米氏方程转换成下式：

$$1/V = K_m/(V_{max} \times [S]) + 1/V_{max}$$

对 $1/V$—$1/[S]$ 作图可得到 L—B 图，这种作图方法因为是采用了 $[S]$ 和 V 的倒数，所以又称为双倒数作图法，如图 4-6。

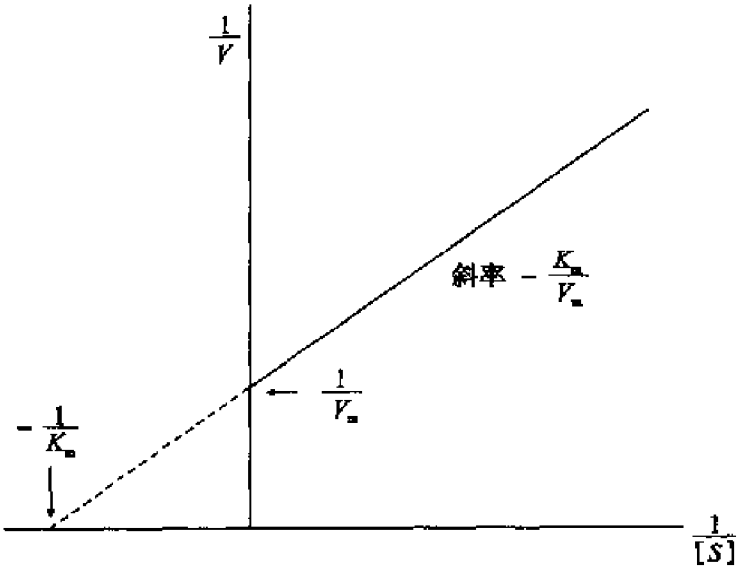


图 4-6　Lineweaver-Burk 作图法

这种作图法是在1960—1970年最常用的作图法。但在作图过程当中，当$[S]$数值较小时，反应速度很小，本身测定的一个小的误差经过倒数后将误差显著地放大了；$[S]$数值较大时，数据点又聚于图形的左下方，影响作图的准确性。解决的方法一般是：将底物的浓度值的倒数($1/[S]$)配成等差，并配以最小的二乘法回归分析。

其他的作图法还有如Hanes作图法，其公式由米氏方程转换为

$$[S]/V = [S]/V_{max} + K_m/V_{max}$$

相对应的图形以$[S]/V$—$[S]$作图。这种作图法的优点是数据点分布均匀，缺点也是误差在倒数后被放大，见图 4-7。

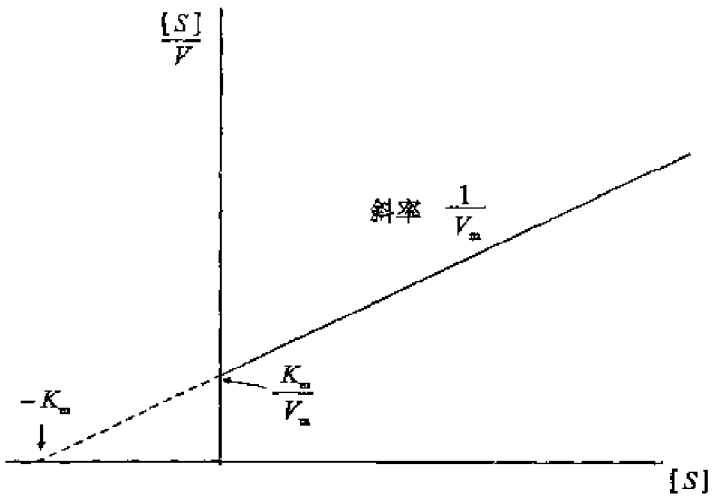


图 4-7 Hanes 作图法

Eadie-Hofstee 作图法：其公式是 $V=V_{max}-(K_m\times V)/[S]$。这种作图法的点分布不均匀，但没有将误差放大，有较高的可信度，还可以从图形中看出各种因素的影响。见图 4-8。

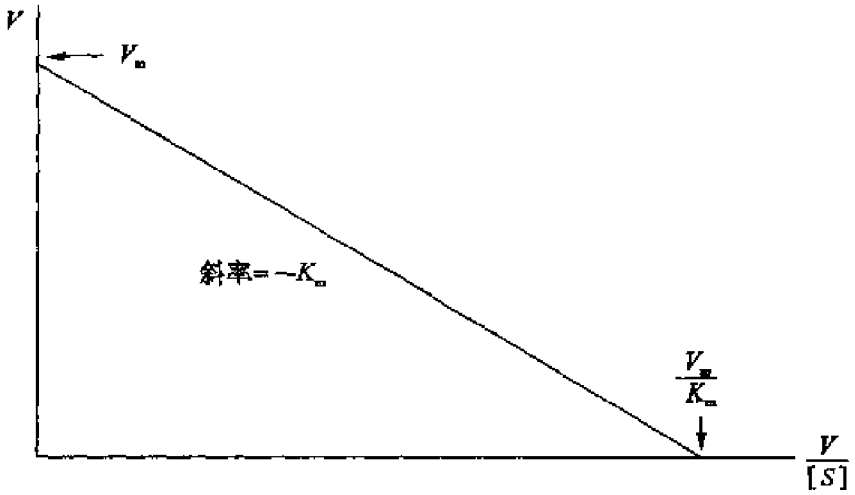


图 4-8 Eadie-Hofstee 作图法

还有其他的作图法其公式如下：

(1)$\lg(V_{max}-V)/V=\lg K_m-\lg[S]$，$V-\lg[S]$作图

(2)$(2.3/t)\lg\{[S_0]/[S]\}-\{[S_0]-[S]\}/t$ 作图

除了米氏常数，酶的重要活性参数还有 K_{cat}(转化率)和 I. U.(国际单位)。

I. U.(国际单位)：指在 25 ℃，以最适底物浓度、最适缓冲液的离子强度以及最适的 pH 等条件，每分钟能催化生成 1 μmol 产物的酶量为一个酶活性单位。

K_{at}：在最适条件下，每秒钟能使 1 mol 底物转化的酶量。其中 1 $K_{at}=6\times10^7$ I. U.。

另外，还有一个参数称为比活性。比活性又叫比活力，它是指每毫克酶蛋白所具有的酶活性，以活力单位/mg 或活力单位/ml 来表示。比活性越高，酶越纯。

二、影响酶促反应速度的主要因素：pH、温度、激活剂、抑制剂

1. pH 的影响

每种酶反应都是要在特定的酸碱条件下进行的。由于pH 影响酶活性中心及其附近的各种解离基团甚至是底物的结构，使酶和底物形成一定活性解离形式以促进反应的进行或者破坏这种活性解离形式，从而阻碍酶和底物结合。每一种酶都有一个最适pH，高于或低于这个数值时，酶的活性都要骤然下降。酶的活性都只能在特定的pH 范围内。通常都要制备相关的两条曲线，分别是酶稳定性—pH 曲线和酶活力曲线。如下图，制备酶稳定性—pH 曲线的方法是先将酶溶液分成若干份，然后分别置于不同的pH 溶液中保温一定时间，最后再调整至某一相同的pH 进行活性测定。应当注意介质的组成和最终溶液的底物浓度、温度的一致性，这样才能保证曲线体现出的pH 对酶稳定性产生的影响。

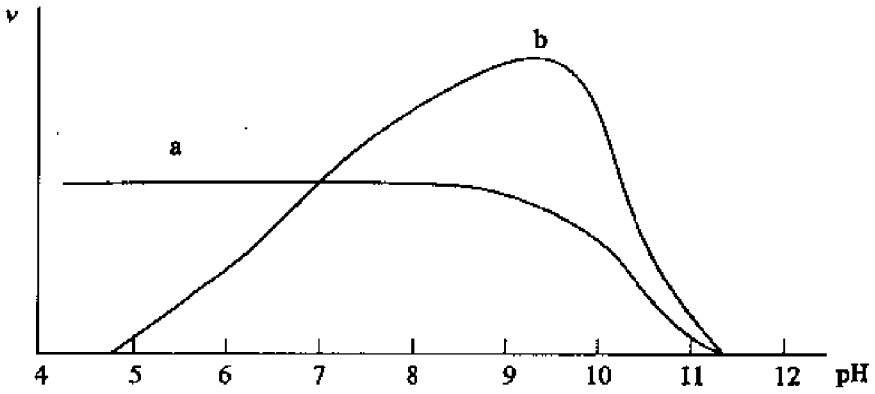


图 4-9　pH 对酶反应的影响

a：酶稳定性—pH 曲线　b：酶活性—pH 曲线

2. 温度的影响

在不同温度下进行某种酶反应，然后再将测得的反应速度对温度作图，可得到下图。

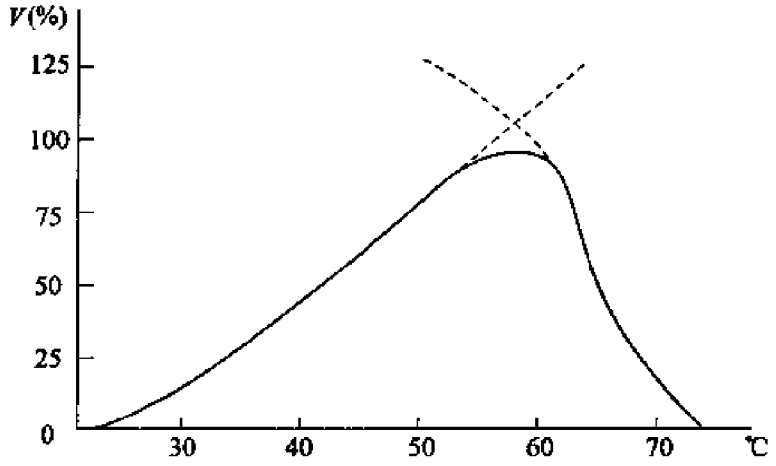


图 4-10　温度对酶反应的影响

可以看到在较低的温度范围内，酶反应的速度随着温度的升高而增大，但超过一定的反应温度后，酶促反应的速度却迅速地下降了。这通常被认为是有两个阶段的影响：首先，在较低的温度下，温度升高加速了酶的活力，同时也使分子跃过活化能阀的几率提高，从而提高了反应的速度；随着温度升高到了一定的程度后，酶蛋白的变性影响了酶促反应的速度，使酶促反应的速度逐渐下降。这里要注意的是，温度升高同时具有两方面的作用：在反应的最初阶段，酶蛋白随温度的变性不明显，此时酶促反应主要体现了温度提高反应速度的作用；由于温度促使酶变性是随着时间累加的，当时间逐渐延长后，酶蛋白的变性就明显了，最后可能使酶蛋白变性抵消了温度升高所提高的反应速度，最后酶失去活性。

3. 激活剂的影响

许多酶在进行催化作用时，需要一些物质存在以激活或增强其活性，这些物质统称为激活剂，它包括无机离子，辅助因子(辅基与辅酶)以及一些大分子蛋白质类物质。激活的作用，一般认为可能有以下几个方面：

(1)解除抑制剂的抑制作用：例如H_2S通过与重金属离子结合，从而解除重金属对酶的抑制作用。

(2)酶原活化：酶原转变为有活性的酶，多数是由于消除了酶蛋白中原来妨碍活性的抑制因素。

$$\text{胰蛋白酶原} \xrightarrow{\text{肠激酶}} \text{胰蛋白酶} + 6\text{肽}$$

(3)辅基和辅酶是构成某些酶的必要组成部分，是有活性的全酶的必要成分。

(4)无机离子可以激活许多酶类：例如Zn^{2+}可以激活碳酸酐酶，Cu^{2+}可以激活抗坏血酸氧化酶和酪氨酸酶。

4. 酶的抑制剂

任何能使酶的活性降低或丧失的作用都称为酶的抑制作用。

通过改变蛋白质上的必需基团或辅酶、辅基的化学性质而引起酶活性的降低，对于这种对酶活性起抑制作用的物质，就称为酶的抑制剂。

对于酶的抑制作用基本上可分为两个大类：

(1)不可逆抑制作用：抑制剂与酶的必需的基团(活性中心上的侧链)以共价键结合。例如巯基相连的辅因子的酶常常被重金属不可逆地抑制了，如汞、铅等。由于铅中毒引起的贫血，就是铅与亚铁螯合酶发生键合，抑制了这种酶催化Fe^{2+}输送氧到血红素中的功能，从而导致酶的活力下降。发生了这类抑制的酶无法通过如透析、凝胶过滤等方法使酶分子的活力恢复，所以称之为不可逆抑制，又称为酶的修饰抑制。

(2)可逆抑制作用：抑制剂与酶的必需的基团以非共价键作用，这时可以通过如透析、凝胶过滤等方法使酶分子的活力恢复。

区别可逆和不可逆抑制的方法除了利用一些物理的手段，还可以采用化学动力学的方法来鉴定，以下做简要介绍。

A. 将不等量的酶加入装有等量的底物和抑制剂的试管中，使各管的体积相等，测定酶促反应的初速度，并用酶浓度对其作图。当抑制剂为可逆抑制剂时，应得到一条过原点但斜率较小的直线；若抑制剂是不可逆抑制剂时，得到的是一条与不加抑制剂的过原点的直线相

平行的直线。这里要注意的是，在测定时一定要保证底物的浓度要大大地饱和酶，这样才能得到明确的实验现象，如图4-11。

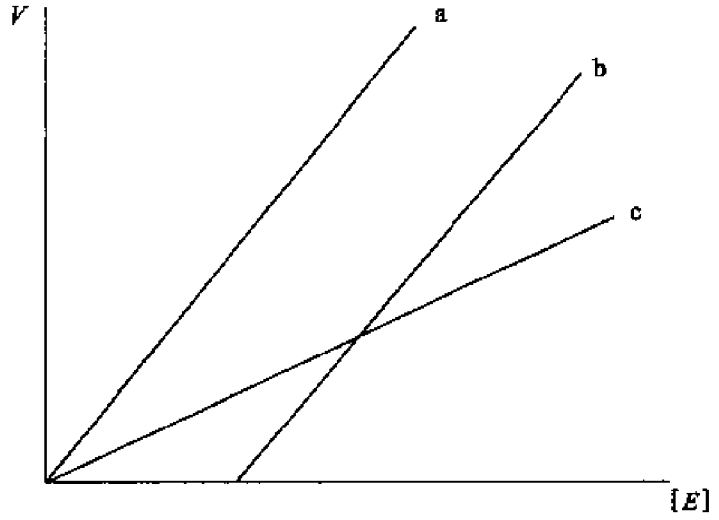


图4-11　不可逆抑制与可逆抑制的鉴别

a：无抑制剂　b：有不可逆抑制剂　c：有可逆抑制剂

B. 将一定量的抑制剂先与一定量的酶保温一定的时间后，取出不同量的混合液加至等量的底物中，各管的体积要保持相等，测定反应的初速度，也用酶浓度对反应初速度作图。抑制剂若为不可逆抑制剂时，部分酶被抑制剂结合，相当于减少了酶的浓度，此时所得为过原点的一条直线；若所测的为可逆抑制剂，按以上步骤将可以得到一个过原点且下弯的曲线，这是由于抑制剂会因为受到稀释的影响，使酶的活力不断变化。如图4-12。

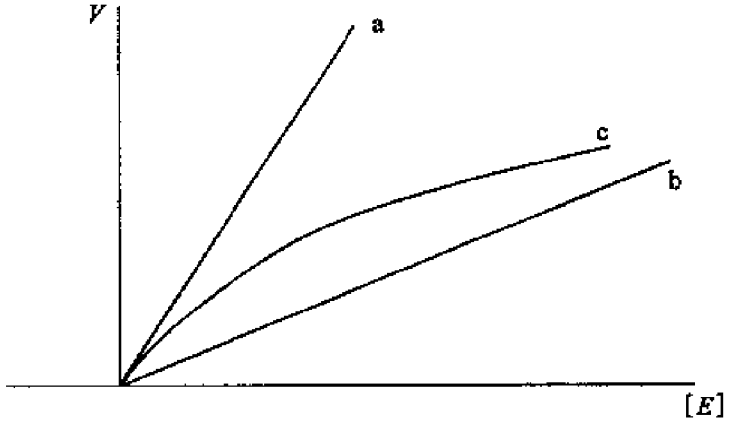


图4-12　不可逆抑制与可逆抑制的鉴别

a：无抑制剂　b：有不可逆抑制剂　c：有可逆抑制剂

在酶的可逆抑制中，又可以根据抑制剂和酶作用的部位的不同，划分为同位抑制剂和别位抑制剂。同位抑制剂（竞争性抑制剂）在分子结构上与底物相似，在反应过程中与底物同时竞争酶的活性中心，并能与酶的活性中心可逆地键合，从而也产生了一个与酶—底物复合物

等效的酶—抑制剂复合物（EI）。EI 的平衡浓度与游离的抑制剂的浓度、EI 的解离常数、酶的底物浓度及酶的浓度相关。当抑制剂与酶结合后，酶就无法再与底物结合生成产物，体现为酶的活性下降。这种抑制剂的最大特点是，对于相同的抑制剂浓度、相同的酶浓度，当底物浓度足够大时，酶活所有的活性中心又重新被底物占据，这样酶的活性又恢复了，并且可以达到酶的最大反应速度（V_{max}），但此时酶的 K_m 已经变大了。K_m 的变大说明受到竞争性抑制剂作用的酶对底物的亲和力变小。因为这类抑制剂和酶结合的位置与酶的正常底物和酶结合的位置是一致的，所以又称其为"底位抑制剂"。别位抑制剂（非竞争性抑制）：属于非竞争性抑制，抑制剂与酶的非活性部位相连，有酶—抑制剂复合物和酶—抑制剂—底物两种复合物形成。抑制剂与酶的键连，改变了酶的三维外形并乱碍了催化反应。例如AMP 是果糖-1，6-二磷酸酶的非竞争性抑制剂。非竞争性抑制剂的特点是不可以通过加大底物的浓度来使反应速度达到 V_{max}，但是酶的 K_m 值却没有变化。因为这类抑制剂和酶结合的位置与酶的正常底物和酶结合的位置是不一致的，所以又称其为别位抑制剂。

为了更好地说明这一问题，图4-13 中 a、b 分别体现了两种不同的抑制机理。

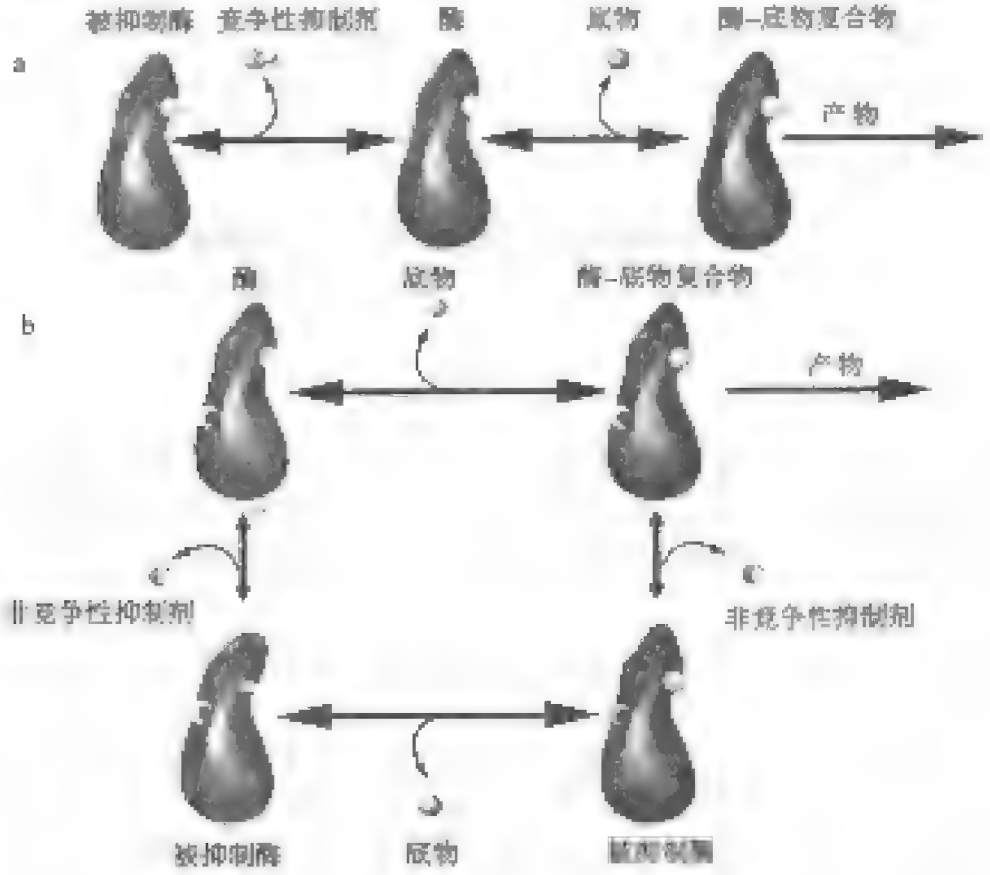


图4-13　竞争性抑制与非竞争性抑制的比较

a 竞争性抑制　b 非竞争性抑制

在实验中，对于竞争性和非竞争性抑制的区别一般采用酶的双倒数曲线的特征来判定，如图4-14：对于竞争性抑制，酶与受抑制剂作用的酶会有一个相同的 V_{max}，却有不同的 K_m；对

于非竞争性抑制剂，酶与受抑制剂作用的酶会有一个不同的V_{max}，却有相同的K_m。图4-14中，a为竞争性抑制作用下的L-B曲线，b为非竞争性抑制作用下的L-B曲线。

使酶促反应速度下降的原因通常还可能是：

A. 通常将由于酶蛋白变性而引起的酶活性的丧失称为失活或钝化。钝化的方法有高温、强酸或强碱等；

B. 去激活作用。对于某些酶，去除其体现酶活力所必须的金属离子，如用EDTA去除酶中的Mg^{2+}后，可能降低这种酶的活性；

C. 酶的阻遏作用。它是针对细胞内酶蛋白的数量因为代谢过程而减少，使酶促反应的速度下降，但是每个酶分子的催化能力并没有下降而言的。

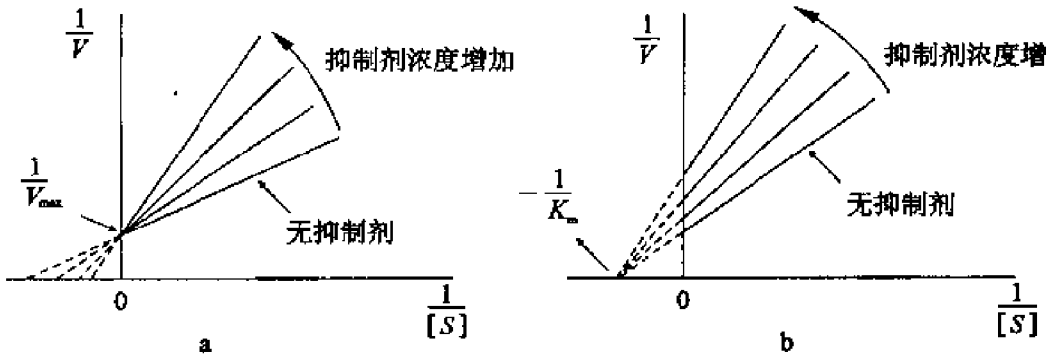


图4-14 竞争性和非竞争性抑制作用下的L-B曲线

a竞争性抑制作用下L-B曲线 b非竞争性作用下L-B曲线

三、酶的催化机理

酶能够大大降低反应所需要的活化能。动力学无法为我们提供这类信息或只是提供了很少部分的酶的催化机理。生物化学家使用其他的技术研究了酶的催化机理，以寻找出酶活性与酶的结构、活性中心功能的关系，常采用的手段有X射线晶体衍射、化学方法、底物与抑制剂作用的简单模型。

关于酶与底物作用机理的假说重要的有："钥匙假说"(lock and key thoery)、"变形张力假说"、"诱导契合假说"(induc-fit thoery)。

(1)"钥匙假说"(模板假说)：1897年，E. Fischer首先提出以解释酶作用的专一性，认为底物分子或底物分子的一部分像钥匙一样，专一地楔入到酶的活性中心部位，也就是说，只有固定的底物分子才能够与酶表面的与之相适应的部位结合，并进行化学反应。见图4-15。

为了更好地解释酶的立体专一性，后人在这个学说的基础上又发展了"三点附着假说"，形象地说明了酶的立体构型的专一性。见图4-16。

(2)"变形(张力)假说"：Jenk认为酶中某些基团或离子使底物分子中的一些键发生了"变形"，产生了张力，从而使得键的反应性得到加强，降低了在这些化学键上发生反应的活化能。

(3)"诱导契合假说"：1973年，D. Koshland提出了诱导契合假说。这种模型的最重要的

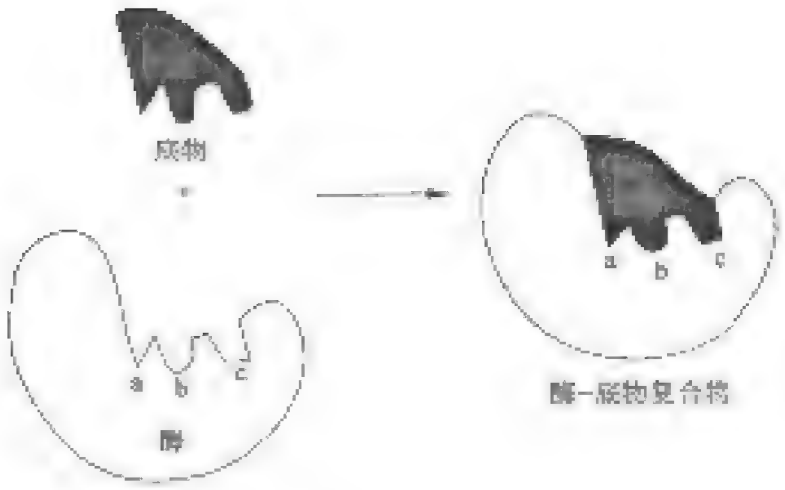


图 4-15　酶与底物的相互关系　　酶与底物的"锁与钥匙关系"学说示意图

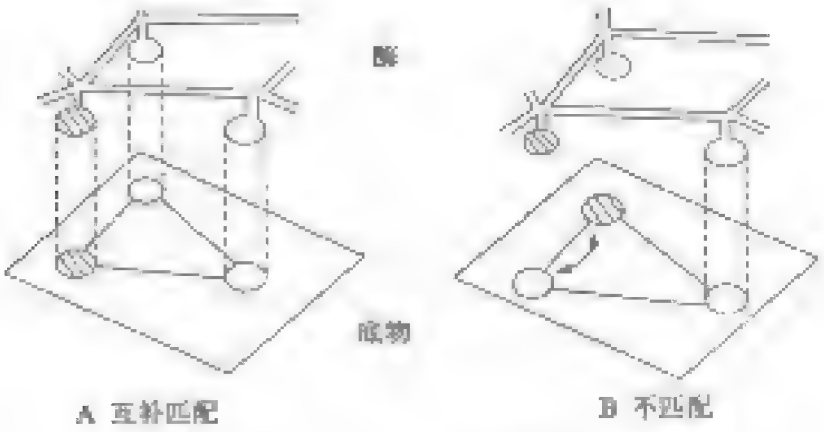


图 4-16　三点附着假说"示意图"

特点是认为酶的活性中心具有弹性(flexibility)。在开始时，酶的活性中心可能并不适合底物分子，在反应开始后，底物能够诱导出酶的一种构象，使酶活性中心发生适应底物的构象，进行结合底物或进行催化或兼而有之。

虽然对酶的催化做了大量的研究，但只对很少一部分酶的催化细节有了解，不过越来越明显的是酶和其他非酶催化剂的催化机理是一样的。酶之所以能获得特别高的催化活性是因为活性中心有特别的促进催化的结构。

一般认为有 4 个因素对酶的催化做出了贡献：

(1)亲和与张力效应：当一个生化反应发生时，底物就进入酶的活性部位并与具有催化能力的官能团靠近，并且底物必须精确地朝向催化基团，一旦底物被精确地定位后，在酶的结构上将发生一个变化，这个变化将导致产生一个受张力作用的酶底物的混合物。这个张力有助于酶底物产生过渡态，通常在过渡态下活性位置与底物结合得更紧，反应速度更大。

(2)静电效应：静电相互作用的强弱与溶剂分子减少化学基团的吸引力有关，因为非闪

质通常存在憎水作用，因此水分子被排除到活性位置之外，这导致了活性位置的介电常数很低。在相对无水的活性位置，电荷的分散对底物的化学反应活性有影响。另外，弱的静电相互作用，如永久和诱导偶极都被认为对催化过程有帮助。酶对底物有效的键合，可以降低酶—底物复合物这个过渡态中电荷的分布，使复合物的能量降低，促进了反应的发生。

(3)酸碱催化：化学基团常常在得到或失去一个质子后，就会变得更具有反应活性，这些基团可以称做阿累尼乌斯酸或阿累尼乌斯碱。酶活性部位的侧链可以作为质子的给予体或接受体，如组氨酸的侧链因为其pKa接近于6，在机体的pH范围内可离子化，通常参与了催化过程，加入一个质子后组氨酸成为一个阿累尼乌斯酸，一旦它失去了质子就变成一个阿累尼乌斯碱。

质子的转移在化学变化中是一个很常见的特征，例如脂的水解。由于水是弱的亲核试剂，脂的水解在中性溶液中是相对缓慢的，若pH上升水解反应就发生的快了。当水化的离子进攻羰基上极化的碳原子，一个四面体的中间体就这样形成了，当中间体被破坏，质子就被传递到附近的水分子上，当醇被释放后，反应就完成，然而，羟基离子的这种催化方式在生命体内是不可行的。酶常常用几个官能团像阿累尼乌斯碱一样传递质子，这样的基团可以精确与底物相互定位。脂的水解也可以被阿累尼乌斯酸所催化，因为当羰基上的氧原子与质子相连时，碳原子变得带正电性，这样脂就更易被亲核的水分子进攻。

(4)共价键催化：在一些酶中，酶的亲核侧链基团与底物形成一个不稳定的共价键，形成酶—底物复合物，接着形成产物。丝氨酸蛋白酶类是用丝氨酸的—CH_2—OH基团为亲核试剂水解肽键(胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等消化酶以及凝血酶等都属丝氨酸蛋白酶)的，在第一步中，亲核试剂进攻羰基，当酯键形成的时候肽键也就断裂了，接着酰基—酶被水解。还有一些其他的氨基酸侧链可以作为亲核试剂，如半胱氨酸的巯基、天冬氨酸和谷氨酸的羧基及组氨酸的咪唑基。一些金属阳离子和辅酶也有助于催化。

酶的催化过程中的辅助因子的任务：

活性位置上的氨基酸负责催化质子的转移和亲核取代。要催化另一些反应，酶需要非蛋白质类的辅助因子，包括金属阳离子和辅酶。

金属：在生物体内的重要的金属元素可以分为两类，过渡金属和碱土金属。由于它们的电子结构，过渡金属常常参与催化，虽然碱金属和碱土金属在有机体中有重要的功能，但它们很少被发现与蛋白质结合，所以我们的讨论集中在过渡金属对酶的影响上。

几个过渡金属的性质使它们在催化中变得有用，金属离子提供了一个高的电荷密度，这在键合小分子时尤其有用。过渡金属的行为与路易斯酸相同，它们是有效的亲核试剂，而氨基酸侧链是一个不良的亲电试剂，因为它们很难接受未共用的电子对，它们的化合价允许其与两个或多个配体相结合。金属离子有助于帮助底物朝向活性部位，于是底物—金属离子复合物极化了底物并促进了催化过程，例如当锌离子作为某个酶的辅助因子，它极化了水分子，形成了一个锌离子与OH键连的形式(严格地说锌不是过渡金属，但它的性质与过渡金属类似)，接着羟基集团进攻CO_2转化成HCO_3^-，见图4-17。

四、酶的调节

成千上万的酶催化的化学反应被组织以形成生物化学路线，每条路线又由多个快速的

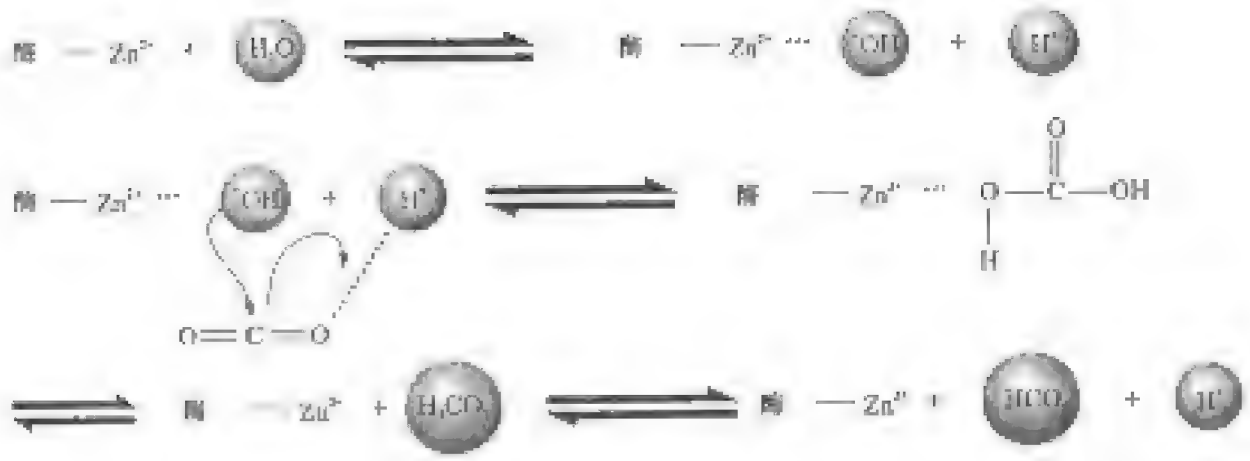


图4-17　过渡金属在酶催化中的作用

催化步骤组成，第一个反应的产物成了下一个反应的反应物，很多反应可以从一个路线转到另一个路线。例如，动物通过酮酸二酸盐在两个步骤的反应后形成谷氨酸，然而大肠杆菌合成色氨酸需要13个步骤。通常生化反应的路线都有分支点。

因为以下几个原因，生物体采用了高级的方式来控制生物化学的路径。

(1)为了维持有序的状态，对每一个路径的控制都能及时产生维持细胞机构与功能的物质，而不浪费。

(2)贮存能量：细胞常常控制产能反应，使之只消耗能满足能量要求的营养物质。

(3)环境变化的反应：细胞可以相对迅速地增加或降低专门的反应来适应温度、pH、离子浓度和营养物的浓度变化。

对于生物化学路径的控制更复杂，它主要通过调整某种酶的浓度和活性来实现，控制的手段可以是基因控制、共价键改性、别位控制和分区的方法。

基因控制：酶的合成随着新陈代谢要求的变化而变化，这种现象被称为酶感应。这种现象也使得细胞能够对环境进行有效地适应。例如：大肠杆菌在移入培养基时，如果培养基中不含有乳糖，大肠杆菌就不会对这种营养进行代谢；大肠杆菌被引入缺少葡萄糖而含有乳糖的环境中时，生物体就产生了利用乳糖作为能量来源的酶，当所有的乳糖被消耗后，这些酶的合成也就结束了。合成特定的酶也可被特定地抑制，生化路线的最终产物也许是抑制了路线中关键的酶的合成。例如，在大肠杆菌中一些氨基酸合成路线的产物就可以抑制关键的酶的合成。

共价键的改性：一些酶通过活性与非活性的可逆变化来控制，几种共价键修饰酶结构就可以达到这种效果。这一类酶中的许多是通过特定的残基的磷酸化和脱磷酸化来达到的，例如肝糖磷酸化酶催化肝糖降解的第一个反应。这个过程由激素控制，在特定的丝氨酸残基上加入一个磷酸基团，会使非活性的形式转化为活性的形式。另一些可逆的改性方式有甲基化、乙酰化和腺嘌呤化。

几种以非活性前体形式产生并被储存的酶，我们称其为酶原。酶原通过可逆地断开一个或多个肽键而转化为活性态酶。例如，凝乳蛋白酶原在胰腺中产生，当它到小肠时，通过几个步骤转化成了活性态。起初，胰蛋白酶断开精氨酸15和异亮氨酸16之间的肽键，接着酶原又

断开另一些肽键，生成了助于消化蛋白质的活性酶。另一些酶通过部分的水解也能达到这样的结果，这类酶有胃蛋白酶、胰岛素、弹性蛋白酶和凝血酶。

别位控制：1940 年 Dische 在研究中发现，红细胞溶血液中的葡萄糖磷酸化作用可以被磷酸甘油酸专一地抑制。根据当时的理论，这个抑制剂不是与底物类似的物质，也不是磷酸化反应的直接产物。1961—1963 年 Jacob 和 Monod 才提出了别构酶的理论，把这种与底物或产物结构毫不相像的抑制现象称为别构效应。对天冬氨酸转氨甲酰酶（ATC 酶，一种典型的别构酶）的研究使得对别构酶的作用方式和动力学等理论有了进一步的了解。现在认为 ATC 酶是合成 CTP 的多酶体系反应序列的第一个酶，其正常底物为天冬氨酸，它受到 CTP 的反馈抑制，CTP 和 ATP 分别是它的负和正的调节物。不同种属的生物调节物不同。

虽然与符合米氏方程的酶同样具有被激活和被抑制的可能，但是由代谢调节物造成的抑制作用不服从于典型的竞争性、非竞争性和反竞争性抑制作用的数量关系。对于别构酶的这种行为，现在比较重要的两种理论是：同构模型（MWC 模型）和渐变模型（KNF 模型）。

同构模型：它假设酶存在两个状态——紧张态（tensed state）和松弛态（relaxed state）。底物和活化剂更容易与松弛态的酶结合，而抑制剂更倾向于与紧张态的酶结合。同构模型中认为，蛋白质中所有的组成部分在第一个效应物质连上之后结构就全部发生了变化，但保持了蛋白质的对称性。磷酸果糖激酶就符合这一模型，它催化 ATP 的磷酸盐取代果糖-6-磷酸的 C1 上的羟基。这个反应是糖酵解的重要的控制点。磷酸果糖激酶具有 4 个同样的亚基，每个亚基都有一个活性位置和一个别构位置。酶可以被 ADP 与 AMP 及其他物质激活，有的会被磷酸烯醇丙酮酸盐或酯抑制，柠檬酸盐和 ATP 也抑制反应。酶上连接了可导致别构的因素后，就可以适应细胞内能量的需要和产能物质的变化。动力学的数据也证实了磷酸果糖激酶有两种结构：松弛态和紧张态。当果糖-6-磷酸连接到酶时，所有的亚基都从紧张态转换到松弛态。同构模型认为没有紧张（T）态和松弛（R）态同时存在的结构。

虽然同构模型解释了别构酶的几个方面，但它还是有一些局限的。首先，对于解释复杂的酶的行为用了过于简单的方法。例如，它无法解释负协同现象，这种现象是指当一些酶上接了第一个配合物后会降低酶对相似配合物的亲和性。同构模型可以解释正协同效应。正协同效应是指：第一个配合物与酶相连后，加强了后继的配合物与酶的连接。

在渐变模型中，它假定蛋白质是有弹性的，配合物与多亚基的蛋白质中的一个亚基结合，从而影响到蛋白质的结构并影响到邻近的亚基。这种更为成熟的模型允许出现中间的结构。负反馈效应可以被这种模型所解释。一个配合物连接到亚基上，可以导致其他相邻的亚基的变化，使配合物与亚基的结合变得很难。比较图 4-18 可以看出两种模型的区别。

要强调的是，同构模型和渐变模型都是一个理论模型，许多别构酶的行为是无法用这些模型来解释的。比如，血色素对氧气的连接协同效应同时具有两种模型的共同特征，当它连接了一个氧气分子之后，就开始了同构模型中的紧张态向松弛态的变化，同时还使其他亚基也发生了有渐变模型特征的小变化。另外，在血色素中只有很少数这种现象被观察到。

分区：在真核细胞中，生物化学路线被分隔在不同的细胞器中，这样做的目的是使反应更易于控制。例如脂肪酸是在细胞质中，而氧化脂肪酸以产生能量的反应却是在线粒体中，通过使用激素或其他方式，控制特定分子通过线粒体膜到达其中。这两个过程的紧密协调可以防止能量的浪费：当细胞能量高时就发生净合成，当细胞能量低时就发生净氧化。分区的

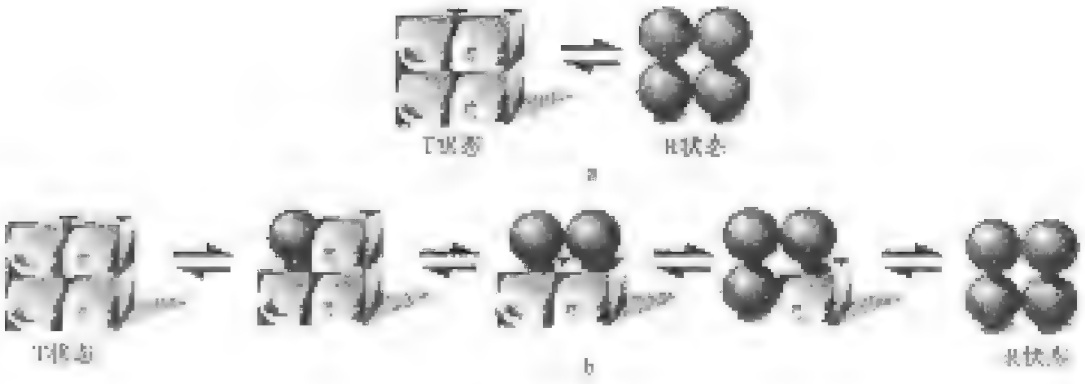


图 4-18 别构酶的理论模型
a:齐核模型 b:渐变模型

另一个原因是:不同的细胞器可以集中专一的物质和辅酶,并且在细胞器内部有专门的微环境与之相协调,使酶促反应能更快、更好的进行。

第四节 固定化酶

一、固定化酶的定义和意义

所谓固定化酶,是指通过物理化学方法将酶固定于可溶或不可溶高分子支持物(载体)上而成的一种酶制剂形式。

固定化酶曾有不同的名称,如水不溶性酶、膜相酶等,但由于形成的固定化酶不一定是水不溶性的,也不一定有相的分离,因此现在普遍接受用固定化酶这一名称。实际上它也包括固定化菌体、固定化细胞、固定化细胞器和固定化辅酶等。

固定化酶的出现单除了"游离酶"在应用上的许多不利因素,为酶在工农业生产和医药实践上的应用开拓了更广阔的前景。它的优越性表现在:

(1)在反应后容易和反应物分离,能反复使用;

(2)可做成各种应用形式,简化工艺,扩大应用面,并有利于实现管道化、连续化;

(3)60%以上的酶在固定化以后稳定性提高。此外,固定化也可作为研究酶在细胞内性态的实验模型。

二、酶的固定化方法

酶的固定化方法大体可以概括为四种类型,见图4-19。

1. 吸附法

包括物理吸附和离子交换吸附。吸附法的优点是:操作简便,条件温和,吸附剂可再生反复使用。但是,它们有一个突出的缺点,就是酶和载体的吸附力比较弱,容易在不适宜的pH、

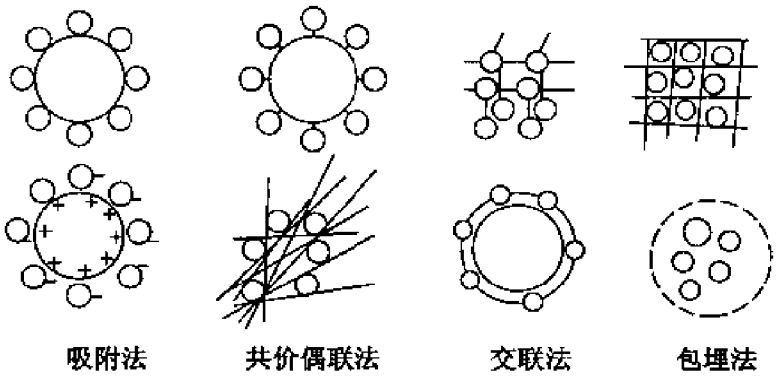


图 4-19　酶的四种固定化方法

高盐浓度、高底物浓度或高温条件下解吸脱落。

2. 共价偶联法

这是借助共价键将酶的活性非必须侧链基团和载体的功能基团进行偶联以制备固定化酶的方法。由于这样得到的固定化酶结合牢固、稳定性好、利于连续使用，因此它是目前应用和报道得最多的一类方法。不过，共价偶联反应一般比较激烈，容易使酶失效。共价偶联常用的载体是纤维素，琼脂糖以及聚丙烯酰胺胶等，也可用无机载体如多孔玻璃等。常用的偶联反应有：图 4-20、4-21、4-22、4-23，其代表反应分别是溴化氰-亚胺碳酸盐反应、重氮反应、芳香烃化反应、叠重反应。

(1)溴化氰-亚胺碳酸盐反应

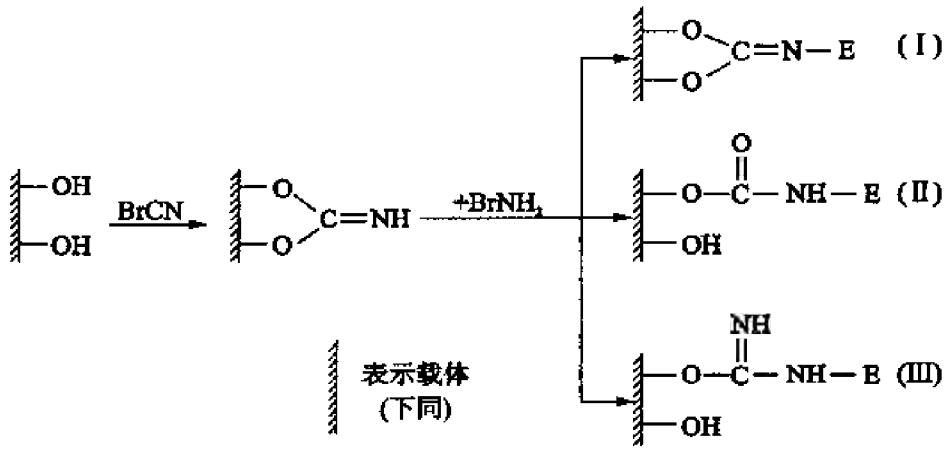


图 4-20　溴化氰—亚胺碳酸盐反应示意图

(2)重氮反应

(3)芳香烃化反应

(4)叠重反应

由于共价偶联反应比较激烈，因此应注意严格控制反应条件，必要时可以加底物或抑制剂保护，反应后再除去。

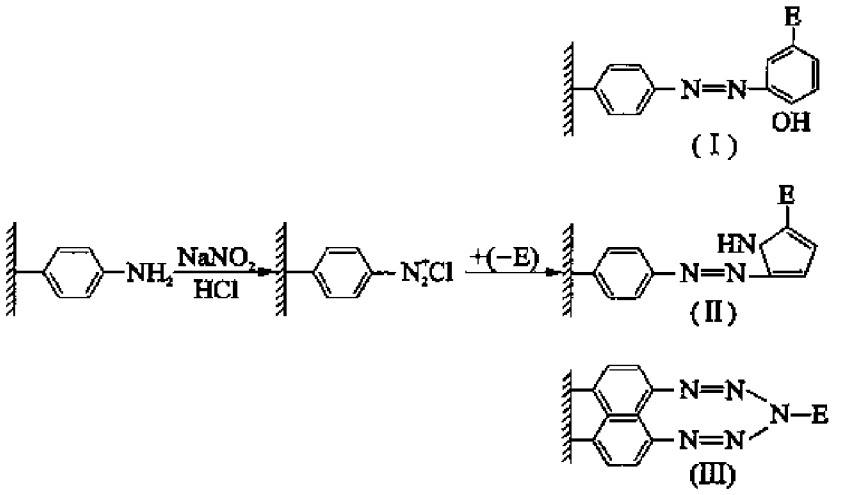


图 4-21　重氮反应示意图

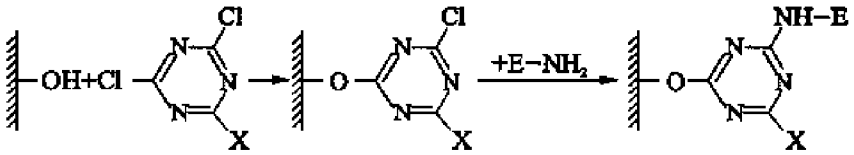


图 4-22　芳香烃化反应示意图

X=Cl，$-NH_2$，-发色团

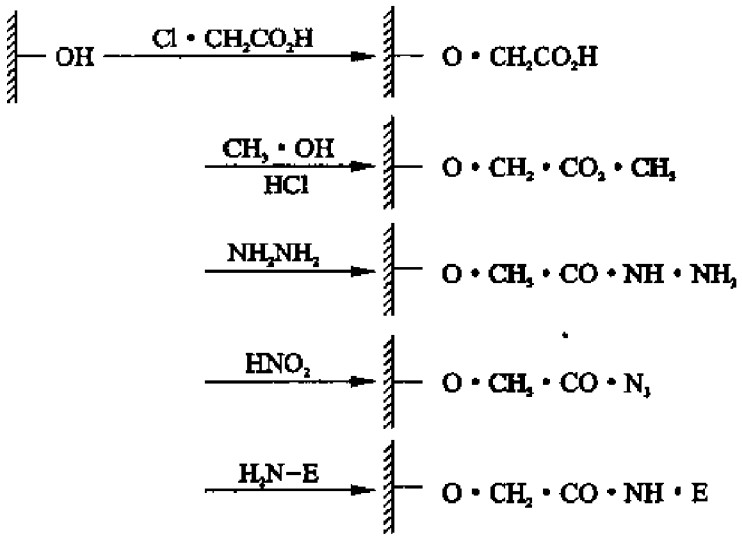


图 4-23　叠重反应示意图

3. 交联法

这是利用双功能试剂在酶分子间，或酶分子与载体间，或酶分子与惰性蛋白间进行交联

反应以制备固定化酶的方法。常用的双功能试剂如戊二醛，其反应如图 4-24：

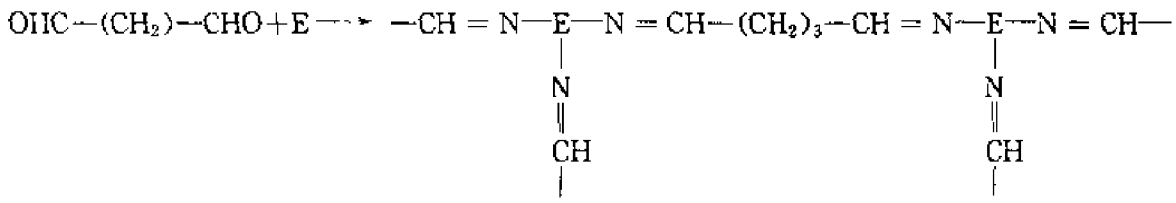


图 4-24　戊二醛与酶交联反应示意图

交联反应可能发生在酶分子间，也可能发生于酶分子内。一般地说，在酶浓度低时，主要形成分子内交联，交联后酶通常仍保持溶解状态；在高浓度条件下，分子间的交联比例上升，形成的固定化酶往往变为不溶态。

仅通过酶分子间交联形成的固定化酶，颗粒一般很小，而且机械性能不佳，为此往往先将酶吸附于载体上或者包埋于胶内或微囊内，然后再用双功能或多功能试剂进行交联，做成固定化酶或酶网颗粒。这种固定化酶空间位阻效应较小。

交联法操作简便，但交联反应往往比较激烈，需采取以下保护措施：①在交联反应前先用抑制剂或底物进行专一性保护；②在交联反应系统中添加惰性蛋白，如血清蛋白、明胶等。

4. 包埋法

这是将聚合物的单体和酶溶液混合后，再借助聚合促进剂（包括交联剂）的作用进行聚合，使酶包埋于聚合物中以达到固定化的方法。由于酶本身一般不参与结合反应，因而比较安全。不过在化学聚合的过程中由于自由基的产生、放热以及酶和试剂间发生化学反应等，往往可能导致酶失效，在选择包埋方法和控制条件时仍须注意。

包埋法有两种类型：格型包埋和微囊型包埋。前者是将酶分子分散包埋在聚合的胶格中，后者是将一定量的酶溶液包在半透性的微孔膜内。

（1）格型包埋：最常用的包埋剂如聚丙烯酰胺胶，它以丙烯酰胺为单体、N，N′-甲叉双烯酰胺为交联剂聚合而成的。包埋时，先将酶和丙烯酰胺单体分散于疏水介质中，然后再进行聚合。包埋剂除了聚丙烯酰胺胶外，其他还有淀粉胶、硅橡胶等。值得提到的是近年来发展了三类十分有用的包埋剂：一是对γ射线等敏感的聚合胶，如聚乙烯吡咯烷、聚乙烯醇、聚α-羟乙基丙烯酸等；二是光敏性聚合树脂如NEGM、ENT、ENTP，它们只要与酶液混合，在光增敏剂存在下，光照数分钟就可得到固定化酶，而且将ENT和EATP以不同比例混合使用时，还可以调节固定化酶的亲水性和疏水性；第三类是聚氨甲酸酯衍生物，控制其中聚乙烯醇的含量，得到的胶亲水性和疏水性也不同。

（2）微囊型包埋　用直径几十到几百微米、厚约25 nm的半透膜将酶分子包埋固定化的方法。半透膜能容许小分子底物和产物自由出入囊内外，由于囊的表面积相对体积的比值大，故这种交换可以进行得十分迅速；另一方面半透膜能阻止蛋白质分子渗透和进入，注入体内后可避免引起免疫过敏反应，因此具有医学价值而受到人们的注意。常用的微胶囊包埋剂有尼龙膜、火棉胶、醋酸纤维素等。尼龙膜一般采用界面聚合包埋，即将亲水单体和疏水单体——例如酶和己二胺的水溶液与含癸二酰氯的有机溶剂（如氯仿或甲苯）——加以混合，再加Span乳化，这样两种单体就将在水相和有机相的界面上聚合，形成包埋酶的尼龙膜珠

粒，Tween20 破乳化后即可得所需要的微囊包埋酶。火棉胶和醋酸纤维素则通常采用界面凝聚法，这是利用高聚物在水相和有机相的界面上溶解度极度降低而凝聚形成皮膜将酶包埋的方法。例如，可先将酶的水溶液在含有硝酸纤维素的乙醚溶液中乳化分散，然后再加入苯甲酸丁酯促使硝酸纤维素在酶液液滴周围凝聚，最后用 Tween20 破乳化后就可以得到含酶的火棉胶胶囊。又例如，可先将酶的水溶液和含醋酸纤维的有机溶剂混合做成乳浊液，然后将之喷入适宜的凝聚剂内，就可得包埋酶的纤维。这种纤维表面积和重量的比值很高，包埋酶容量大，稳定性好。此外，控制沉淀条件还可调节纤维的孔径，纤维又可做成纸和布，工艺能放大，一般认为此法有很大的工业应用潜力。

酶也可用脂质体包埋。先将磷脂酰乙醇胺(胆碱、丝氨酸)和卵磷脂－胆固醇按一定比例混合，然后直接喷入酶溶液，或者在转瓶内壁分散成薄膜再加入酶溶液，当两相迅速混合时就会自发形成脂质体囊泡结构。酶分子分布于脂质双层结构中或附着于脂质体表面。脂质体的特点是：它具有一定的机械性能，能专一地将酶携带到体内特定部位(如网状内皮系统)再将酶释放；脂质体还可和某些物质(如抗体)结合，赋予其定向运转特性，因此它在药物应用方面颇受人们重视。

各种固定化方法的特点概括如表 4-5。

表 4-5　各种固定化酶方法的比较

方　法	优　点	缺　点
吸附法	制作条件温和、简便；成本低；载体可反复使用	对离子强度、pH 和温度等因子敏感，因而酶易损漏；酶装载容量一般较小
共价偶联法	载体与酶偶联的方法多种多样；固定化的酶非常稳定，损漏少	偶联试剂对生命组织多有一定毒性；偶联条件激烈，易引起酶失效；成本高
交联法	可用的交联试剂多，技术简易；稳定性较高	交联条件较激烈，常出现扩散限制，使用有一定困难
包埋法	可进行大量的固定化；包埋膜可选用生物相容材料，并可做成任意大小；胶格包埋用胶可做成所需要的厚度与硬度	仅可用于低分子量的底物，不适用于柱系统，反应常受扩散限制，不是所有单体材料与溶剂都适用于各种酶

三、细胞(菌体)的固定化

固定化细胞(菌体)的意义在于：(1)可省去酶的分离纯化，大大降低成本；(2)可作为单一酶发挥作用，也可利用它包含的复合酶系完成复杂的反应。

细胞的固定化可以采用酶的固定化方法，但其中包埋用得较多，近年来甚至应用此法进

行生长细胞的固定。其他方法虽有应用，但极为成功的例子不多。除此外，对于菌体，有时还采用直接固定法，即在不使用载体的情况下，借助物理或化学方法(加热，β射线照射，加柠檬酸、各种结絮剂、交联剂、变性剂等)处理，直接将细胞固定。直接固定法的优点是：(1)可使细胞内起破坏作用的蛋白酶等变性，防止所需要的酶被降解失效；(2)使细胞结构固定，防止酶逃逸；(3)使菌体聚集，形成较大的颗粒。

固定化菌体的主要问题之一是细胞壁(膜)形成的透性屏障，通常办法是用甲苯等处理。

固定化生长菌体的主要问题是氧和营养物质难以进入包埋胶内部，故这一方法对厌氧菌较为合适。

四、辅酶及偶联酶系的固定化

1. 辅酶固定化的意义

辅酶物质固定于高分子载体有以下几个方面的意义：(1)做成酶的亲和吸附剂；(2)为固定化酶提供必要的辅酶物质；(3)制成“人工催化剂”，并为研究酶的作用机制提供实验模型。

2. 辅酶物质的固定化

辅酶物质的固定一般采用载体共价偶联法。在进行辅酶物质的固定化时，十分重要的是要保持它们的催化功能基团以及它们与酶蛋白结合的基团处于游离状态。以磷酸吡哆醛的固定化为例，除了它的功能基团(醛基)和与酶蛋白结合的基团外，可用于和载体偶联的基团如下图所示，有A、B、C三处。与此相关，固定化方法也有三种。

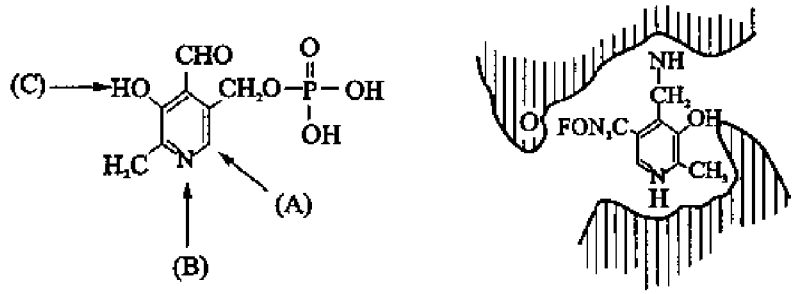


图4-25 磷酸吡哆醛可用于和载体偶联的基团

五、固定化酶的性质

由于固定化可能对酶本身和酶所处的环境产生一定的影响，因此固定化酶和“游离”酶表现出来的性态不同，掌握这些性质对有效地应用固定化酶和研究酶的生物学作用都很重要。

1. 固定化对酶活性及酶反应系统的影响因素

(1)构象改变、立体屏蔽以及微扰效应

构象改变是指固定化过程中酶和载体的相互作用引起了酶的活性中心的构象发生了改变，从而导致酶活性下降的一种效应。立体屏蔽是由于载体的孔隙大小，或由于固定化方式与位置不当，给酶的活性中心造成了空间障碍，因而底物等无法和酶接触，从而影响酶活性

的一种效应。见图4-26。微扰是由于载体的亲水、疏水性质和介质的介电常数等直接影响酶的催化能力的一种效应。以上这些效应都难于定量描写和预见，只能通过实验做出判断与调节。

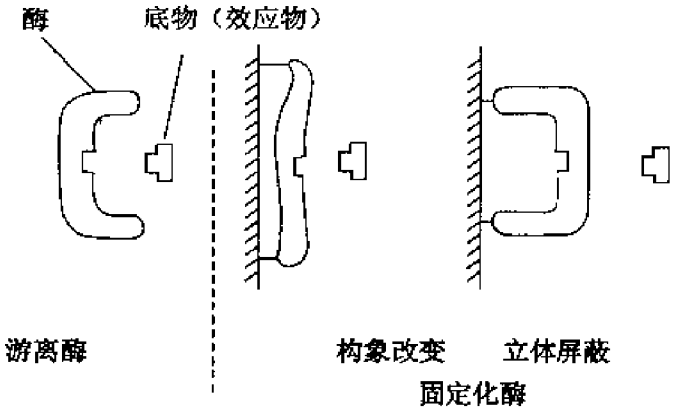


图4-26 固定化酶的构象改变与立体屏蔽示意图

(2)分配效应和扩散限制这两种效应和微环境密切相关

所谓微环境，是指和固定化酶紧邻的局部微观环境，它和宏观体系不同，是引入了固定化后产生的新概念，见图4-27。分配效应是由于固定化载体的亲水和疏水性质使酶的底物、产物以及其他效应物在微观环境与宏观体系间发生了不等分配，改变了酶反应系统的组成平衡，从而影响酶反应速度的一种效应。分配效应可以通过分配系数来定量描述，作为一般规律：如果载体与底物带有相同电荷，反应系统的K_m将因固定化而增大，反之，带有相反电荷K_m将减小，产物及其他效应物的情况也类似；当载体带正电荷时，酶固定化后，酶的最适pH向酸性方向偏移，反之阴离子载体将导致pH向碱性方向偏移；上述效应可以通过提高介质的离子强度而减弱或消除；采用疏水性载体时，如底物为极性物质或电荷物质，则其K_m将因酶的固定化而升高，如底物同样为疏水物质则K_m将降低。

扩散限制效应是指底物、产物以及其他效应物的迁移和运转速度受到限制的一种效应，它包括两种类型——外扩散限制和内扩散限制。外扩散限制是指上述物质从宏观体系穿过包围在固定化酶颗粒周围的近乎停滞的液膜层(又称为Nernst层)到颗粒表面所受到的限制；内扩散限制则是指上述物质从颗粒表面到颗粒内部酶所在位点所受到的限制。作为一般规律，外扩散限制效应往往可通过充分搅拌和混合减轻或消除，内扩散限制效应则取决于载体的性质。

(3)酶作用的专一性

通常固定化酶作用的专一性和游离酶基本相同，但某些对大分子底物作用的酶，如蛋白酶、葡萄糖淀粉酶等，由于载体与固定化方法的缘故，可能会给它的某些底物造成立体障碍，从而导致“专一性的改变”。

酶作用的“最适温度”：酶作用一般都有一个“最适温度”，它和酶的稳定性有关。大多数酶在固定化以后热稳定性有所升高，因此其最适温度也往往升高，但酶反应的活化能则较少改变。

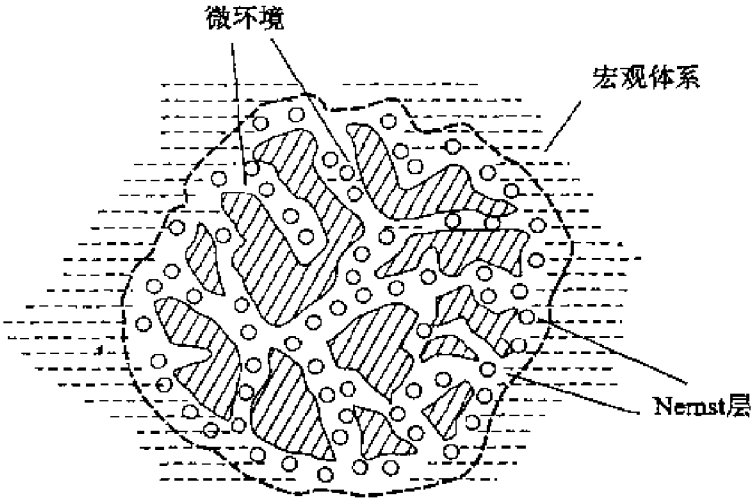


图 4-27　宏观体系与微观环境示意图

2. 固定化对酶稳定性的影响

大多数酶在固定化以后有较高的稳定性和较长的有效寿命，其原因可能是：(1)固定化增加了酶构型(象)的牢固程度；(2)阻挡了不利因素对酶的侵袭；(3)限制了酶分子间的相互作用。但是，如果固定化触及酶的活性敏感区，也可能导致稳定性下降。

固定化酶稳定性升高表现在：(1)增加了酶的耐热性；(2)增大了酶对变性剂、抑制剂的抵抗力；(3)能减轻蛋白酶的破坏作用；(4)可以延长酶的操作和保存的有效期。

3. 固定化细胞的性质

与固定化酶相比，固定化细胞的情况比较复杂：固定化对酶产生的各种影响对细胞同样产生作用；由于细胞内环境的相对稳定和细胞的"缓冲作用"，固定化对细胞内酶产生的影响在某些方面不像固定化酶那样显著；固定化细胞中的(内)酶的活性除了受固定化因素的影响外，还受细胞结构及细胞膜透性的影响。

固定生长菌体的情况更复杂，固定化不仅能直接影响菌体的活性与酶活性及酶稳定性，也可能对菌体的生长能力与酶的生成产生影响。

六、固定化酶的应用

1. 固定化酶在工农业生产上的应用

这是固定化酶应用的一个主要方面。和游离酶相比，它可能发挥三个方面的优越性：(1)能反复使用，使生产成本大大降低；为实现管道化、连续化与自动化提供可能，为建立新型的酶法与化学法结合的工艺以及酶法处理三废开辟道路。(2)酶或细胞经过固定化后往往会获得对有机溶剂的抵抗能力，因此它可能用于进行某些非水系统的反应，如甾体激素的生化转化，在某些情况下它也可能用于使酶促水解反应逆向进行，如固定化的α-胰凝乳蛋白酶可在高浓度有机溶剂中催化脂合成。(3)固定化细胞的发展，特别是固定化生长菌体的发展，为需要辅酶系统和多酶系统进行的反应及某些需要发酵进行的生产提供了可能。固定化酶

在工农业生产方面的应用近年来发展很快，某些已经正式投产，某些尚在实验阶段。

表 4-6 固定化酶(细胞)在工业生产上的应用

产 物	酶细胞	固定化方法	原 料	现 状
1. *L*-氨基酸	氨基酰化酶	载体结合法	乙酰-*DL*-氨基酸	1969 投产
2. 果糖浆	葡萄糖异构酶或含有该酶之菌体	载体结合法或交联法	葡萄糖	1973 投产
3. 6-APA	青霉素酰胺酶	载体结合法	青霉素 G	1973 投产
4. *L*-门冬氨酸	含有门冬氨酸酶的菌体	胶格包埋法	反丁烯二酸	1973 投产
5. *L*-苹果酸	含有反丁烯二酸酶的菌体	胶格包埋法	反丁烯二酸	1974 投产
6. 低乳糖牛奶	乳糖酶(*β*-半乳糖苷酶)	载体结合法	牛奶	1977 投产
7. 奶酪	碱性蛋白酶	载体结合法	牛奶	试验中
8. 干蛋白	葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶	胶格包埋法	蛋白	试验中
9. 果汁脱苦	柚苷酶	载体结合法	桔类果汁	试验中
10. 啤酒	木瓜蛋白酶	载体结合法或包埋法	生啤酒	试验中
11. 植物白脱	脂肪酶	胶格包埋法	植物油	试验中
12. 脂肪酸	脂肪酶	载体结合法	植物油	试验中
13. 类固醇	含脱氢酶及羟化酶的菌体	胶格包埋法	类固醇前体	试验中
14. *L*-丙氨酸	含有*L*-门冬氨酸、*β*-脱羧酶的菌体	包埋法	*L*-门冬氨酸	试验中
15. *D*-苯甘氨酸	氨基酰化酶	载体结合法	乙酰-*DL*-苯基甘氨酸	试验中
16. ATP	乙酰激酶	载体结合法	ADP	试验中
17. 核甘酸类味精	5′-磷酸二酯酶，5′-腺苷酸脱氨酶等	载体结合法	RNA	试验中
18. 乙 醇[①]	Sacharomyces carlsbergensis 或 S. Cerevisiac	角叉胶或聚丙烯酰胺胶包埋	葡萄糖培养基	试验中
19. 啤 酒	同 上	聚乙烯氧或多孔砖吸附或海藻酸包埋		试验中
20. L-亮氨酸	Serratia marcescens	角叉胶包埋	苏氨酸培养基	试验中
21. 乙 酸	Acetobacter. sp	水合氧化钛吸附	乙醇培养基	试验中
22. 乳 酸	乳酸杆菌与酵母	明胶包埋		试验中
23. 淀粉酶	Bacillus substilis	聚丙烯酰胺胶包埋		试验中
24. 杆菌肽	Bacillas sp.	聚丙烯酰胺胶包埋		试验中
25. 氢 气	Clostridium butyricum	聚丙烯酰胺或		试验中

续表

产　物	酶细胞	固定化方法	原　料	现　状
	Rhodospirillium rubrum	琼脂包埋		
应用内容	菌　体	固定化方法	毒　物	现　状
26. 废水处理②	Candida tropicalis	聚丙烯酰胺胶包埋	酚	试验中
	Pseadomonasputida	聚丙烯酰胺胶包埋	苯	试验中
	各种微生物混合培养	皂土和 Mg^{2+} 或聚氨基甲酸乙酯海绵	废　水	试验中
27. 脱氮作用	Pseudomonas sp.	活性炭吸附液膜	亚硝酸、硝酸	试验中
	Micrococcus deuitrificans			

①从 18 以后为固定化生长菌的应用

②26,27 为固定化生长菌体在三废处理上的应用

2. 固定化酶在医药治疗上的应用

"游离"酶用于治疗时有一些"致命"弱点，即"游离"酶注射入人体以后一般将产生 3 个问题：(1)酶作为异体物质，反复应用会导致免疫反应；(2)酶是蛋白质，在体内易被网状内皮系统移除和被蛋白酶水解破坏；(3)由于稀释效应，药物酶无法集中于靶器官组织以达到最适治疗所需要的高浓度。溶液酶的这些缺点，通过选择适当的载体与方法将药物酶固定化以后就能逐一地加以解决，见表 4-7。

表 4-7　某些具有代表性的固定化药物酶

酶	应用方式	载　体	应用对象	半寿期	优缺点
尿酸酶	组成体外循环	血液透析装置			优点：加速尿酸移去 缺点：需移去尿酸产物——尿囊素
门冬酰胺酶	移　接	Dacron 脉管修复用的移接管	急性白血病	约两天	优点：无免疫原性质 缺点：酶吸潜、堵塞及形成血栓
脲　酶	体内循环	尼龙微囊	尿	一　天	优点：易制备 缺点：消亡快 载体有毒，难清除
脂肪酶	口　服	肠衣包被	胰机能不全	一天	优点：抗酸
酪氨酸酶	体内循环	可溶性的聚顺丁烯二酸与聚丙烯酸的聚合物	癌　瘤	24 h	优点：最适 pH 向中性偏移 缺点：易移除

续表

酶	应用方式	载　体	应用对象	半寿期	优缺点
谷氨酰胺酶	体内循环	可溶性的聚乙二醇	癌　瘤	24 h	优点：无抗原性，半寿期延长
β-葡糖苷酸酶	体内循环	血影细胞	取代和补偿先天缺失(肝)	18 h	优点：无免疫抗原性 缺点：蛋白可能从RBC中突出
β-葡糖苷酸酶	体内循环	脂质体	补偿先天缺失		优点：载体能被代谢 缺点：对载体和内含物敏感
胆红素葡糖醛酸基转移酶	体内循环	和聚乙烯吡咯烷酮结合的微粒体	黄　疸		优点：不需要分离酶 缺点：需使辅助因子扩散到微粒体内
过氧化氢酶	体内循环	尼龙微囊		短　暂	优点：能做成糊状 缺点：在唾液很快移除

3. 固定化酶在分析化学中的应用

在生化分析和临床检验中应用的固定化酶，可大体分为两种类型：酶感应器和固定化酶柱检测器。酶感应器是将酶固定并结合于感应器上组成的分析装置，包括两类：(1)酶电极，可以测定电流变化或电压变化，电流变化和被测物质的浓度一般是线性函数关系，电压变化与被测物质的浓度变化则为对数关系，见表4-8；(2)酶反应热感应器，通过感应酶反应过程的热变化进行检测。

固定化酶柱检测器包括两部分：固定化酶柱和检测器。它的特点是酶柱和检测器可以分离组合，即同一酶柱可和不同的检测器自由组合。

表4-8　某些酶电极

被测化合物	固定化酶	电极感应器	测定范围(mol/L)
腺苷单磷酸	AMP脱氨酶	NH_4^+ 电极	
醇	醇氧化酶	Pt/O_2 电极	
D-氨基酸	D-氨基酸氧化酶	NH_4^+ 电极	$10^{-5}\sim10^{-2}$
L-氨基酸	L-氨基酸氧化酶	NH_4^+ 电极	$10^{-4}\sim10^{-2}$
扁桃苷	β-葡萄糖苷酶	CN^- 电极	$10^{-5}\sim10^{-2}$
L-门冬酰胺	L-门冬酰胺酶	NH_4^+ 电极	$5\times10^{-6}\sim10^{-2}$
D-葡萄糖	葡萄糖氧化酶	Pt/醌电极	$10^{-5}\sim10^{-4}$
	葡萄糖氧化酶	Pt/O_2 电极	$10^{-5}\sim10^{-4}$
	葡萄糖氧化酶/过氧化氢酶	Pt/H_2O_2 电极	

续表

被测化合物	固定化酶	电极感应器	测定范围(mol/L)
葡萄糖-6-磷酸	碱性磷酸酯酶/葡萄糖氧化酶	Pt/O_2 电极	
L-谷氨酰胺	谷氨酰胺酶	NH_4^+ 电极	$10^{-4}\sim10^{-1}$
乳　酸	乳酸脱氢酶	Pt/铁氰化物电极	$10^{-4}\sim10^{-2}$
青霉素	青霉素酶	pH 电极	$10^{-4}\sim10^{-2}$
L-苯丙氨酸	*L*-氨基酸氧化酶	NH_4^+ 电极	$10^{-5}\sim10^{-2}$
	L-氨基酸氧化酶/过氧物酶	Pt/H_2O_2 电极	$10^{-5}\sim10^{-3}$
磷酸酯	碱性磷酸酯酶/葡萄糖氧化酶	Pt/H_2O_2 电极	
酪氨酸	酪氨酸脱羧酶	CO_2 电极	$10^{-4}\sim10^{-1}$
尿　素	脲　酶	CO_2 电极	$10^{-4}\sim10^{-1}$
		NH_4^+ 电极	$10^{-5}\sim10^{-1}$
尿　酸	尿酸酶	pH 电极	
		Pt/O_2 电极	

七、酶的改造和模拟

为适应生产实践的需要，在采用微生物发酵生产酶的同时，人们正通过各种方式进行酶的改造与模拟。

1. 酶的改造

(1)加固酶的活性结构、增强其稳定性

通常有以下办法：添加惰性蛋白、盐类、底物、辅酶等配体物质以及某些有机溶剂如多聚醇等，并在低温下保存；进行化学修饰，特别是进行分子内、分子间交联，使酶活性结构得到维持和加固。例如，用还原剂处理可以保持和恢复巯基酶的活性，将淀粉酶做成聚碳酸酯卤化衍生物后可以经受长时间高温处理，用戊二醛交联修饰的磷酸化酶在耐热、抗冷等方面有保护作用，用右旋糖酐、肝素等修饰胰凝乳蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、尿激酶等能增强它们的稳定性。

(2)改变酶活性的4种方法

①化学修饰　可以针对活性中心部位，也可以在活性中心以外的残基上进行，而且后者的可行性一般更大。但值得强调的是控制修饰条件十分重要，修饰后酶的活性可能上升，也可能下降，专一性以及对辅助因子的要求都可能改变。例如，用乙基马来酰亚胺修饰苹果酸的SH基，可使其原来的脱羧酶活性和还原酶活性发生变化。

②配基置换　例如，将羧肽酶活性必须的锌用钴取代，结果肽酶活性和酯酶活性比完全改变。

③进行有限的肽链水解　天门冬氨酸酶用胰蛋白酶或枯草杆菌蛋白酶等水解，结果使该酶的活性升高了约千倍，有趣的是分别用上述专一性高和专一性低的蛋白酶处理后，引起的活性改变效果却大体相同。

④蛋白质工程　它能使酶得到预见性的修饰与改造，这是种通过计算机将X衍射分析技术、蛋白质溶液构象研究与基因工程技术结合在一起进行的定向修饰。例如，将来源于枯草杆菌的酪氨酸-tRNA合成酶的35位半胱氨酸换成甘氨酸后，可增强该酶对ATP的结合力。

(3)消除免疫原性或抗原性以利于医疗应用

用小分子试剂进行修饰，例如，用亚硝酸脱去天门冬氨酰胺酶N-末端异亮氨酸的氨基与赖氨酸的ε-氨基后，酶的活力不变，但是它在体内的半寿期比天然酶长2倍，疗效也显著提高；也包括用水溶性大分子——特别是应用聚乙二醇进行保护性修饰，例如用聚乙二醇对*L*-谷氨酰胺酸-*L*-门冬酰胺酶、尿酸酶修饰，可完全消除它们的抗原性和免疫性，减慢它们在动物血液循环中的清除速度，修饰后酶的活力保存15%～45%。

2. 酶的模拟

这是根据酶的作用原理研究模拟酶的活性中心和催化机制，用化学合成方法制备高效、高选择性、结构较简单、较稳定的新型催化剂。在酶的模拟过程中，也可参照酶的活性结构，合成简单的小肽。例如，有人合成了一个非天然的34肽，它与单链DNA有亲和性，它的二聚体具有核糖核酸酶活力。但是，现阶段得到的模拟酶无论在催化效率还是在专一性上都较差，要达到应用水平尚需要一个大的突破才行。

第五节　酶的重要应用

酶学经过上百年的发展已经成为生物科学的一门基础理论科学。酶催化的高效、专一以及无需高温、高压、强酸、强碱条件对于普通的化学催化反应来说是一个决定性的飞跃，因此对酶的研究成果不仅会给催化反应理论、催化剂的设计、药物的设计和作用原理、疾病的诊断和治疗及遗传和变异等各方面提供理论依据、新的思想、新的概念，而且在工业、农业、医疗各方面都有十分重大的实际意义。

酶和工农业生产、医学实践的关系可大体概括为如下3个方面。

一、酶制剂的应用

这是应用最早、成效显著，研究也较活跃的一个方面。

1. 酶制剂在工农业生产上的应用

首先它可用于加工生产，例如：用相应的酶水解淀粉、蛋白质和核酸以生产葡萄糖、氨基酸和核苷酸；用核苷磷酸基转移酶使肌苷磷酸化以生产5′-肌苷酸；用葡萄糖异构酶转化葡

萄糖为果糖；用青霉素酰胺酶水解天然的青霉素以合成新型的青霉素；用来源于无色杆菌的蛋白酶水解猪型的胰岛素B链羧基末端，使之改造为人型胰岛素等。

酶制剂也可用于改进产品的质量，例如：可用脂肪酶水解乳脂为低级脂肪酸，使之增加奶油风味；用果胶酶澄清果汁、酒汁；用橙皮苷酶消除罐头白浊；用柚苷酶、花青苷酶使果汁脱苦去色；用葡萄糖苷酶、醛氧化酶使大豆消除生臭；也可在食品中添加葡萄糖氧化酶、溶菌酶防腐杀菌。

酶制剂还可以用于革新工艺，例如：纺织工艺利用淀粉酶上浆、退浆，不仅能节省化工原料、缩短工艺时间，还可以减轻劳动强度、提高产品质量；制革工业利用蛋白酶，既能加速皮革浸水、软化、脱毛等过程，又可以从更本上改变旧工艺脏、累、臭的状况；加酶洗涤剂具有洗涤时间短、去污能力强、能延长纺织品的寿命等优点。

最后，酶制剂也可能在处理三废上发挥很大的作用，现在趋向采用固定化酶或固定化微生物处理法代替目前广泛应用的微生物曝气法。例如，将茄病镰刀酶中分离出来的分解氰化物的酶固定化后，高达2 000 ppm的含氰废水只要通过酶柱一次，就可以将氰全部去除。

酶制剂在工农业应用上的主要问题是：寻找合适的酶源，降低酶的生产成本，制成有效的剂型和建立高产的工艺条件。

2. 酶制剂在医疗上的应用

(1)消化酶：这是最早使用的酶制剂，主要由蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶等水解酶组成。后来发现有色人种缺乏乳糖酶，婴幼儿在摄取牛奶时不易消化而下痢，因此有时在消化酶中也包括了乳糖酶。消化酶的改进方向是将上述各种酶以合理的配比做成有一定稳定性的胶囊。

(2)消炎酶：人们很早就已经知道蛋白酶有消炎作用，因此临床上常用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶等治疗炎症、浮肿等疾患以及分解坏死组织。作为消炎酶使用的还有核酸酶、溶菌酶等。链激酶、尿激酶、尿酸酶也可以划属消炎酶，前二者的作用是去除凝血块、治疗血栓静脉炎等，后者则用以分解尿酸以治疗关节炎。消炎酶的需求量正在迅速上升，已有超过消化酶的趋势。

(3)抗肿瘤酶：它与其他抗肿瘤药物的治疗机制完全不同：正常细胞具有*L*-门冬酰胺合成酶等酶类，因而可以从*L*-门冬氨酸、*L*-谷氨酰胺以及酮基琥珀酸酰胺等获得所需要的*L*-门冬酰胺，但是肿瘤细胞缺乏这些酶，只能从血液中获取。在这种情况下，如果给肿瘤患者投注*L*-门冬酰胺酶，切断外源供应，那么肿瘤细胞就会因为缺少必需的*L*-门冬酰胺而“饿死”。据报道，谷氨酰胺酶、精氨酸酶、丝氨酸脱水酶、苯丙氨酸氨解酶以及亮氨酸脱氢酶等也具有抗肿瘤作用。

(4)遗传缺失疾患治疗酶：现在已知由于酶基因缺失而引起的遗传病至少有10种以上。从理论上来说解决的办法有3种：①通过遗传手段在染色体基因组中补进所需要的缺失基因，但这一途径目前尚无现实意义；②供给患者特种食品，即供给不含缺失酶底物的食物，这一办法相当复杂而且代价高昂；③向患者提供所缺失的酶，这一设想早在1964年开始展开，主要用于治疗与溶酶体有关的酶缺失疾患。例如，用淀粉葡萄糖苷酶治疗糖原堆积症已获得了一定的成功，近年来人们正在尝试通过固定化酶来最终解决这一问题。

(5)其他治疗酶：这包括用透明质酸酶提高毛细管的通透性，增进药物的吸收效果，用右

旋糖酐酶防止龋齿等。

已知胰脏中含有约14种酶类。在胰脏的综合利用中发现，其中含有多种酶类可应用于药物中：

①肽释放酶：它具有舒张血管及大动脉的作用，用于高血压、冠状血管及动脉血管硬化的治疗。

②弹性蛋白酶：常被用于治疗动脉硬化，并具有降血脂的疗效。

③胰蛋白酶：是一种消化药，还可用于治疗化脓性溃疡、脓肿、疮疖、虫咬，并可加快伤口愈合和消炎。

④蛋白酶：治疗伤口积血，血肿，各种炎症。

⑤羧肽酶：消化蛋白质及用于多肽结构的测定，具有抗癌作用。

⑥胰岛素：可用于治疗糖尿病、精神分裂症、肝炎，有抗癌作用。

SOD——超氧化物歧化酶：

SOD是20世纪70年代开始进行深入研究的一种药用酶，发展很快，近年来国际已召开了多次学术讨论会。我国于1988年、1990年也分别召开了两次学术讨论会。SOD的动物红细胞提取和采用生物技术生产均已日趋成熟。SOD最有希望用于医学临床领域，除了治疗类风湿性关节炎、心脏病以及其他的心血管疾病、器官移植、器官再植，SOD还用于预防和治疗缺血组织局部的氧自由基引起的损害。这一点日益引起人们的重视。SOD的化学修饰(右旋糖酐、低分子聚蔗糖)在国内已获得成功，使其体内半衰期从原来的5 min分别延长到7 h、14 h和35 h，为临床发挥药效展示了良好的前景。

用含2～20个酰基和4～20个碳原子的饱和或者不饱和脂肪酸的酰化后的SOD衍生物可治疗和预防肺部疾患、眼角膜溃疡、辐射引起的皮肤溃疡、皮炎、烧伤、胃炎及胃溃疡等，还可以将其做成血液稳定剂。

SOD经过修饰后可用于化妆品，其对皮肤的作用如皮肤营养、角质改善、皮肤的润滑性、弹性等指标均比对照组天然的SOD好，并且制品在外观和嗅觉上没有异常。但是天然SOD对黑皮病和肝斑有较好的效果。经过多糖(分子量6万～9万)修饰的SOD也被证明对皮肤营养不良及皮肤干燥、老化有预防效果。

药物酶的应用虽然远未达到预期的水平，但近年来这是十分活跃的研究领域，特别是以注射方式使用药物酶目前还存在着一些急需解决的问题：①异体蛋白引起的免疫反应；②酶制剂纯度不高时，杂质将引起的各种副作用；③酶在体内容易被降解、被代谢，药效期太短；④将药物定向分布到所需要的组织细胞中去。药物酶目前的发展方向是将它制成微型胶囊或制成酶的衍生物。例如，可将酶包埋固定于水溶性或水不溶性的高分子载体中，也可以将酶包埋于血影细胞或脂质体中，这样既能够使酶与免疫系统、蛋白酶隔离开，将酶保护起来，同时也有助于药物被细胞吸收。某些情况下，在脂质体等载体上引入一定的基团，还可能起导向作用，即将药物酶引向相应的治疗部位。药物酶还有一种发展趋势就是将相应的药物酶固定后，组成“人工脏器”，用于治疗先天性酶缺失疾患以及组织功能衰竭所引起的疾患。

酶制剂工业作为一种新型的行业在近20年来得到了迅速的发展，到1974年全世界酶的销售量不过4 000万美元，而1984年年产值达到了4亿美元。酶制剂各种应用的比率大致如表4-9。

表4-9 酶制剂应用比率概况(%)

按酶类型分类		按应用类型分类	
1. 糖苷酶	15	1. 奶酪业	35
2. 蛋白酶	65	2. 洗涤业	25
3. 医药、诊断、研究用酶	15	3. 医　药	25
4. 其他(葡萄糖氧化酶、蔗糖酶等)	5	4. 其　他	15

二、酶分析的应用

所谓酶分析,就是通过对酶反应的测定来达到化学分析和临床检定目的的一类分析方法。酶分析包括两种类型,一类是以酶为分析工具的分析,另一类是以酶为分析对象的分析。前者又称为酶法分析,后者又称为酶活力测定。这两类分析在原理和方法上基本相同。

1. 酶法分析

酶作为高效、高度专一的催化剂,可作为分析试剂或分析工具用于检测样品(如食品、药物以及体液等)中某种物质的含量。酶法分析的应用范围很广,凡是与酶反应有关的物质,如酶的底物、辅助因子,甚至酶的抑制剂等,都可用这种分析方法进行测定。应用这一类方法时,通常先根据待分析对象选择一种适当的"工具酶"进行酶反应,同时借助物理方法或化学方法加以跟踪检测,最后再根据酶反应的动力学将测得的结果分析处理后就可得知所要检测的物质的含量。例如,测定发酵产品中某氨基酸的含量,可选择专一于该氨基酸的脱羧酶作为工具酶,在这种情况下被测对象是酶的底物,根据酶反应过程中放出的CO_2就可以计算出该氨基酸的含量。

与一般的化学方法相比,酶法分析有如下优点:

(1)用来对复杂体系(如发酵液或体液等)中某一成分进行简便、专一的分析。用一般的化学分析法进行检测前,必须进行一系列繁杂的精制、萃取等预处理,但是用酶法分析时则没有这种必要,因为酶是高度专一的催化剂,它能选择地作用其中被分析的成分,使之发生变化而加以测定。很多被测物质本身很不稳定,用普通的化学方法进行分析时,可能在预处理过程中就已被破坏了,但是酶分析既无须预处理,而且反应条件温和,就无这种破坏之虞。

(2)一些物质的测定甚至没有简便、直接的纯化学分析可用,此时可借助酶分析,如辅酶A、有机磷的测定。

酶法分析的主要问题是需要有适宜的、高纯度的、高比活力的工具酶,因而所需的代价较高;其次,工具酶在酶法分析中只起一种温和而且专一的预处理作用,最终测定仍需采用化学方法或物理化学方法检测,因此,酶法分析本身也需要不断地吸取分析化学,特别是近代仪器分析的先进成果来武装自己,发展自己。

(3)某些情况下,在与所选择的工具酶反应后直接进行测定仍不够理想,此时可加入"偶

联指示酶”，使反应继续进行到能简便灵敏地加以检测的阶段。例如测定葡萄糖，通常采用的还原糖法往往不够专一，用酶法分析时，可采用己糖激酶(HK)并偶联葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，因为反应生成的NADPH很易检测，而且灵敏度很高，可检出的浓度达10^{-12} mol/mL。

这种用于酶分析的偶联体系，要求“偶联指示酶”具有比工作酶更高的活力水平。

酶法分析的发展趋势是：首先是简便化，如将工具酶固定于滤纸条上做成“检测试纸”。例如，可将葡萄糖氧化酶、过氧化物酶和邻联茴香胺类的色素源组合在一起制成尿糖试纸，用时只要将试纸在病人尿液中浸湿，根据一定时间后产生的颜色深浅，就能估测出其中葡萄糖的含量。其次是微量化、连续化、自动化，通常的办法是将工具酶做成酶电极或将工具酶固定化做成酶管或酶柱，然后和检测装置偶联。例如临床上现在发展的一种葡萄糖氧化酶电极，只要通过观测氧阴极上的电位的变化，就可简便地检知液体中微量的葡萄糖。这些检测仪近年来进一步和计算机、自动装置结合，以用于自动连续检测。

2. 酶活力测定

目前这类分析主要用于辅助临床诊断，常通过检测体液(特别是血清或血浆)中某些酶活力作为早期诊断、鉴别诊断以及预后的参考。

酶是细胞内合成的，体液内的酶都是来自细胞。引起体液内酶水平变化的大致有以下几种原因：

(1)组织病变导致膜平衡的破坏。在正常情况下，细胞和细胞外液的浓度一般有很大的梯度，只有在细胞不断更新的过程中酶才少量地渗入血液中。但是，当细胞感染炎症时，酶就可能大量地释放到体液中去，例如，谷草转氨酶在心肌中含量最高，心肌梗死疾患情况下，由于组织坏死引起细胞通透性增大，故患者血清中的谷草转氨酶显著升高，高峰时可达正常值的10倍以上。

(2)细胞病变引起合成机能异常，其中有的因疾患而合成下降。例如，有一种称为“血浆特异酶”的卵磷脂胆固醇转酰基酶，它是在肝细胞内合成后分泌到血液而发挥生理作用的。肝炎患者此酶合成下降，因而它在血清中的水平低于正常。

(3)疾患导致酶分泌排出受阻，使酶转流入血液中，这也是血清中酶活性水平变化的原因。例如，梗阻性黄疸或癌转移至肝脏使胆管阻塞时，血清中碱性磷酸酶升高。

(4)药物直接影响酶的活性，如有机磷中毒使血清中乙酰胆碱酯酶的活性受到不可逆的抑制。

酶用于临床诊断的确具有一定的参考价值，但是也存在一个根本性的问题，这就是特异性不高。例如，血清淀粉酶升高常作为急性胰腺炎的指标，但是唾液腺炎、急性腮腺炎、穿孔性肠膜炎，特别是十二指肠溃疡等疾患也可能引起血清淀粉酶升高。为了解决这一问题，现在采取的办法是：

①寻找组织特异酶　如酸性磷酸酯酶主要来自前列腺组织，乙酰胆碱酯酶主要来自红血球，肌酸激酶主要存在于肌肉。

②测定同工酶酶谱　因为有些酶虽不是组织特异的，但是同一种酶在不同组织可能表现为不同的同工酶谱，通过电泳或其他一些方法能加以鉴别。

③酶谱比较　由于每一组织都有其特征酶谱，因此同时测定并比较几种血清酶的变化，能使获得的结果具有较确切的意义。例如，可以同时测GOT/GPT，也可以同时比较血清酶

和尿液酶的活性。但是，酶谱比较的结果受多种因素的影响，而且费时，代价又高，故实际意义不大。

值得提到的是，活力测定也可用于进行病变机制的探讨与药物效果的检定与筛选，还可用于植物生理状况的研究。例如，植物组织受机械或病原性损伤后，引起G6PDH活力局部显著升高，但磷酸葡萄糖异构酶则没有发生变化，因此推测葡萄糖的分解代谢由糖酵解途径转向了戊糖支路。

酶活力测定的发展方向是：(1)简便化　和酶法分析一样，制备成各种检定纸片。例如，用以2,3,4-三苯基四唑浸渍的纸片做成细菌检定纸片，根据是否有还原酶作用而生成红色以判断细菌污染情况。(2)自动化　这是诊断与研究需要进行大量测定时惟一的解决方法，可分为全自动与半自动两种类型。

在结束酶分析的讨论前，值得提到的还有20世纪70年代初期从免疫化学发展起来的酶标免疫分析，由于这类分析能将免疫学方法的专一结合的特点和酶的高效催化特点很好地结合于一身，因此近年来越来越受到重视。酶标免疫分析是将酶作为标记物质，使之和抗体(或抗原)结合形成酶与抗体(或抗原)复合物，然后再根据待测抗原(或待测抗体)与上述复合物专一且定量的结合关系，通过测定与待测抗原(或抗体)结合的标记酶的活力，从而计算出抗原(或抗体)的量。酶标免疫分析和荧光免疫分析或放射免疫分析相比有下述优点：不需要特殊复杂的设备和仪器，灵敏度高，重复性好，对健康无害。这种方法现已扩展到许多学科领域，检测对象并不限于抗原或抗体，也可用于许多药物、激素和抗菌素甚至酶的测定。

三、酶生物学知识的应用

如果掌握了酶的生物学规律，就有可能使酶在生产实践中发挥更大的作用。在医学和农业中，可根据正常与病理情况下酶水平的变化来探讨发病的原因，指导药物的筛选和应用。在工农业生产中，特别是在发酵生产中，可通过对外界条件的控制、遗传因子的改造来进行代谢调节，使生物朝着人类需要的方向发展。以下简述直接应用的几个方面：

1. 药物、农药和毒物

现在应用的许多药物、农药都是酶的抑制剂。由于它们能抑制病菌、昆虫等的某些“关键酶”，从而导致其代谢和机能紊乱，造成其疾病或死亡。最为人熟知的应用就是磺胺药，这是根据某些细菌需要对氨基苯甲酸衍生物为辅酶，而这些辅酶参与的反应有的直接关系到细菌体内的核酸合成，磺胺是该辅酶物质的竞争性类似物，它能抑制上述反应，因此能抑制或杀死细菌达到治疗的目的。另外为人们熟知的有机磷农药，他们的作用机理是能强烈地抑制乙酰胆碱酯酶，引起昆虫生理失调最后导致死亡。根据对该酶结构功能的研究，现在已经制造出了多种高毒性的有机磷化合物。基于同样的原理，也设计出了各种有效的解毒药物，如解磷定等。它是从“相反的方向”竞争性地将有机磷化合物从酶上拉下来，使酶从抑制中解脱出来，从而恢复该酶的正常功能。现在用的“解磷定”正是当时适应国防需要而设计出来的，同样，砒霜等砷化合物解毒药物二巯基丙醇也是当时用来对付发泡糜烂性的路易斯毒气而产生的。

现在应用的许多农药或治疗药物对虫、菌、杂草和病理组织有非常强烈的作用，但是它们往往都缺乏选择性，即其在杀死虫、菌、杂草、癌细胞等的同时，也可能伤害正常的作物、正

常的组织细胞，或者残留下来影响人畜健康，这样就大大限制了它们的应用。为了解决这一问题，可根据不同生物体中酶或酶系统的特征、正常和病理组织中酶或酶系统的差别，找到或者设计制造出专一性很高的农药和治疗药物。例如除草剂DCPA(3,4-二氯丙酰替苯胺)能有效地杀死稗草等，但毫不伤害它的"近亲"——稻，原因在于稻的茎叶中有一种DCPA水解酶，而稗草则不存在；又例如，根据某些癌细胞中酯酶活力比正常的细胞低得多的特点，设计了2,2-二(2-氯乙巯)乙酸乙酯，这种药物能抑制肿瘤生长，但进入正常的细胞后就被迅速地水解，化为低毒物质代谢排出，因此它能专攻癌细胞，用以治疗何杰金氏及乳房癌有良好疗效。

以上讨论说明，如果同时能找出不同生物间、正常和病理细胞间的酶或酶系统的特征差别，就可能使这些药物带上"导弹"，使之选择性地发挥药物的作用。

关于药物和农药的耐药性问题，应用酶的生物学知识也可能有助于解决。如卡那霉素在载有R因子的革兰氏阴性细菌体内就可能诱导出卡那霉素磷酸激酶或转乙酰基酶，它们能分别作用卡那霉素的3′-OH基而形成磷酸酯衍生物或作用6′-NH_2形成酰胺衍生物，使卡那霉素失效。因此，只要将这种药物改造成上述酶不能作用的衍生物后，就有可能提高其抗耐药性的能力。

2. 提高产品的产量

(1)添加酶的抑制剂：在柠檬酸的发酵中总会伴随产生一定比例的异柠檬酸，这是由于菌体内同时存在有顺乌头酸酶，它能使部分柠檬酸转化为异柠檬酸。此时在发酵系统中添加氟乙酸等抑制剂或限制其中Fe^{2+}的供应，就可以减少异柠檬酸的生成，提高柠檬酸的产量。通过诱变获得对氟乙酸敏感的突变株，也能提高柠檬酸的产率。

(2)控制代谢系统中的关键酶：以赖氨酸生产为例，它可采用几种菌进行生产，其中常用的为黄色棒状短杆菌，其合成调节机制如图4-28。

该菌的特点是介质中的赖氨酸对分支途径的第一个酶——二氢吡啶羧酸合成酶没有反馈调控作用，只有赖氨酸与苏氨酸对门冬氨酸激酶表现协同性反馈抑制。根据这一特点，显然只要能控制苏氨酸的浓度，协同反馈抑制就可克服，赖氨酸就可大量合成。后来获得了高丝氨酸脱氢酶缺失的变异株，在进行这种缺陷变异株的培养时必须供应外源的苏氨酸与甲硫氨酸。结果表明，应用这一变异株时，如果将苏氨酸供应维持于限定浓度内，那么培养液中的赖氨酸就可大大提高，达到40 g/L。

(3)应用酶制剂：其作用机理是在发酵体系中添加某些酶制剂后，可以增大菌体细胞的通透性，从而克服反馈抑制。以嗜氨小杆菌生产谷氨酸为例，有人报道，用7%的甜菜糖蜜为糖源时，如果在发酵10 h后添加0.08%的溶菌酶，经过48 h的发酵，谷氨酸产量可提高6倍；如果在发酵4 h后添加10单位/ml的脂肪酶，那么48 h的产量可提高12倍。当然这种办法成本较高。

酶在生产实践上发挥着很大的作用，而且蕴藏着极大的潜力。随着酶学的发展，它的应用还将跃入更新的境界，展现更宽广的前景。

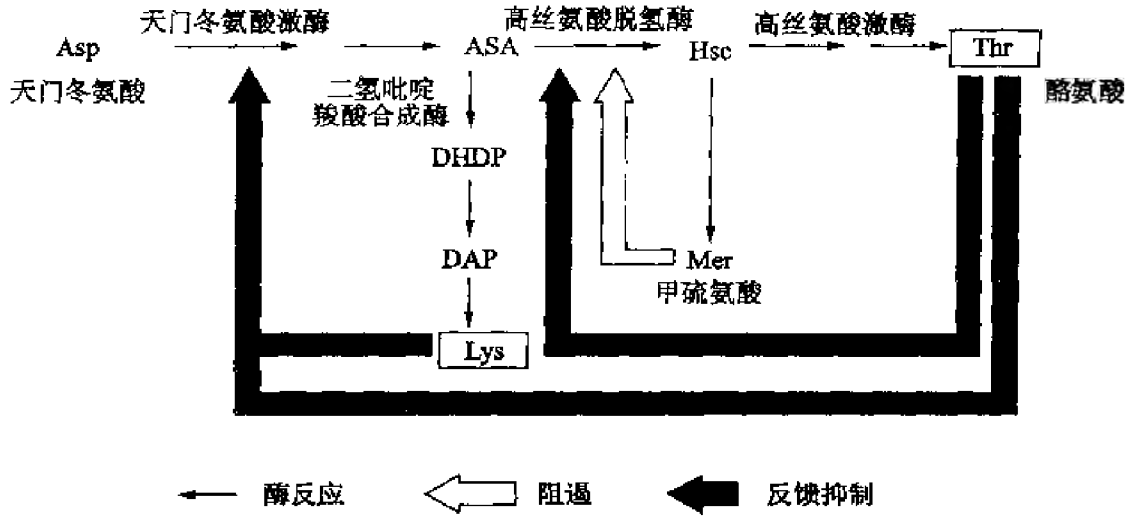


图 4-28　赖氨酸合成的调节机制

主要参考文献

1　Trudy Mckee, James R. Mckee. 生物化学导论. 北京：科学出版社，2001
2　周润琦，陈石根，李致勋. 生物化学基础. 北京：化学工业出版社，1994
3　沈同，王镜岩，赵邦铧. 生物化学. 北京：人民教育出版社，1981
4　李建武. 生物化学. 北京：北京大学出版社，1990
5　罗纪盛，张丽萍，杨建雄. 生物化学简明教程. 北京：高等教育出版社，2001
6　陈惠黎，李文杰. 分子酶学. 北京：人民卫生出版社，1984
7　许根俊. 酶的作用原理. 北京：科学出版社，1981
8　陈啕声，胡学智. 酶制剂生产剂术. 北京：化学工业出版社，1994
9　姜锡瑞. 酶制剂应用技术. 北京：中国轻工业出版社，1996
10　张树政. 酶制剂工业. 北京：科学出版社，1984
11　郭勇，郑穗平. 酶在食品工业中的应用. 北京：中国轻工业出版社，1996
12　黄胜和，马金鉴. 酶在临床上的应用. 天津：天津科学技术出版社，1984
13　方允中，陈能乾. 医学酶学. 北京：人民卫生出版社，1984
14　蒋成淦. 酶免疫测定法. 北京：人民卫生出版社，1984
15　李再资. 生化工程与酶催化. 广州：华南理工大学出版社，1995
16　颜思旭，蔡红玉. 酶催化动力学原理与方法. 厦门：厦门大学出版社，1987
17　陈石根，周润琦. 酶学. 湖南：湖南科学技术出版社，1987
18　邹国林，朱汝躇. 酶学. 武汉：武汉大学出版社，1997
19　周晓云. 酶技术. 北京：石油工业出版社，1995
20　熊振平等. 酶工程. 北京：化学工业出版社，1989
21　钱铭镛. 酶工程基础与酶应用实例. 南京：江苏科学技术出版社，1989
22　[日]清水祥一. 酶分析法的原理和应用. 上海：上海科学技术文献出版社，1982
23　[美]G·G·吉尔西包特著. 缪辉南，陈石根译. 酶法分析手册. 上海：上海科学技术出版社，2002
24　严希康. 生化分离工程. 北京：化学工业出版社，2001

第五章　核酸化学

【本章要点】

一　核酸是遗传物质

二　碱基、核苷和核苷酸

三　核酸的结构、功能、性质及分离

四　病毒的结构、功能及DNA 突变

五　基因工程简介

第一节　核酸是遗传物质

分子遗传学是一门新兴的学科。它是1953 年Waston 和Crick 提出了DNA 双螺旋结构模型，并用它阐明遗传物质复制后建立起来的学科。20 世纪60 年代，人们揭示了三联体密码和蛋白质合成过程，建立了中心法则，与此同时也揭示了基因调控原理以及突变的分子基础等知识，这就大大地丰富了分子遗传学的内容。分子遗传学的发展，推动了其他学科如医学、农学及工程学的发展。1981 年，我国科学家率先合成了具有生物活性的酵母Ala-tRNA 分子，处于世界先进行列。

一、什么是遗传物质

简单地说，遗传现象是指生物繁殖类似自己种类的现象。生物的繁殖过程，不论是单细胞生物还是由成千上万个细胞组成的生物，都是通过细胞分裂来完成的。细菌是一个单细胞，经过分裂成为两个同自己类似的细胞。多细胞高等生物的繁殖是通过两性生殖细胞即精子和卵子的互相融合而实现的。精子和卵子融合成为一个受精卵细胞即合子，然后经过这个合子细胞的无数次分裂产生成千上万的细胞，最后形成一个新的类似亲代的个体。由此可见，产生后代个体的遗传物质是通过上代和下代惟一的桥梁——生殖细胞传递的。而且，每个子细胞必须带有发育类似自身个体的所不可缺少的全部遗传物质。所以说遗传物质存在于细胞之中，在研究遗传物质基础时，必须着眼在细胞水平上，而不是从有机体整体中去寻找遗传物质基础。当然也不能从有机体的器官与组织中去寻找遗传物质，如果那样做的话，将会是大海捞针，一事无成。

细胞是由细胞核、细胞质及细胞膜组成的。既然细胞是遗传物质的传递者，那么究竟是整个细胞是遗传物质基础还是它的个别部分是遗传物质基础？这个问题可以通过科学实验

来回答(图5-1)。

将两种不同的单细胞海藻——伞藻进行嫁接,实验结果说明生物性状的类型决定于细胞核的类型而不决定于细胞质的类型,也就是说遗传物质存在于细胞核中。

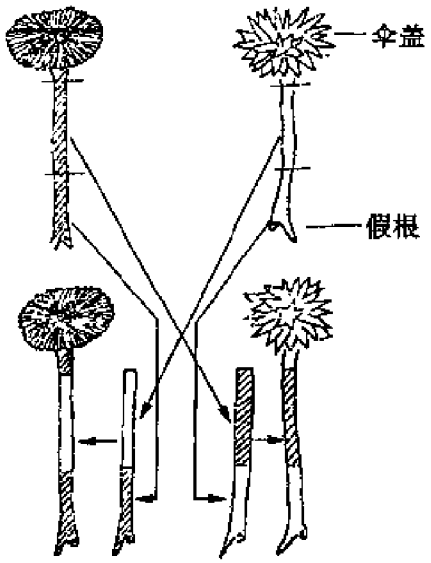


图5-1 两种伞藻的嫁接实验

细胞核由核膜、核液及染色体组成。那么核的什么组成成分具有遗传机能呢?这个问题也可以用实验来说明。20世纪初,Sutton发现染色体的行为与遗传因子(基因)的行为很相似,提出了染色体是遗传物质的载体的假设。后来,Morgan在果蝇的实验中和Etnerson在玉米的实验中得出连锁交换定律,确定基因直线排列在染色体上,由此证明了染色体是基因载体的设想。

下面几个实验是关于染色体的改变直接引起生物性状的改变,以此来证明染色体是基因的载体的设想。

每种生物的每个细胞都有一定数目的染色体,例如人有46条染色体、果蝇有8条染色体、玉米有20条染色体、水稻有24条染色体,而且各个染色体的形状也是恒定的,所以如果染色体的数目或形状改变了,就会引起生物性状的改变,从而可以直观地看到载有遗传物质的染色体的改变与性状改变之间的因果关系。

果蝇和其他双翅目昆虫的幼虫唾腺细胞中的染色体特别大,要比其他细胞的染色体大约200倍。果蝇的4条唾腺染色体(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ及Ⅳ)不仅大,而且其表面上具有许多明显的横纹。每根唾腺染色体的横纹数目、排列及其大小都是恒定的,因此这些横纹可以作为识别唾腺染色体的标志。我们可能把每根染色体不等的分为许多大区,用阿拉伯数字标记上,每一大区又可分成6区,用A、B、C、D、E及F标记上。每个区各自包括许多斑纹,而斑纹数是不等的,可用1、2、3……n等数字标记上(图5-2)。

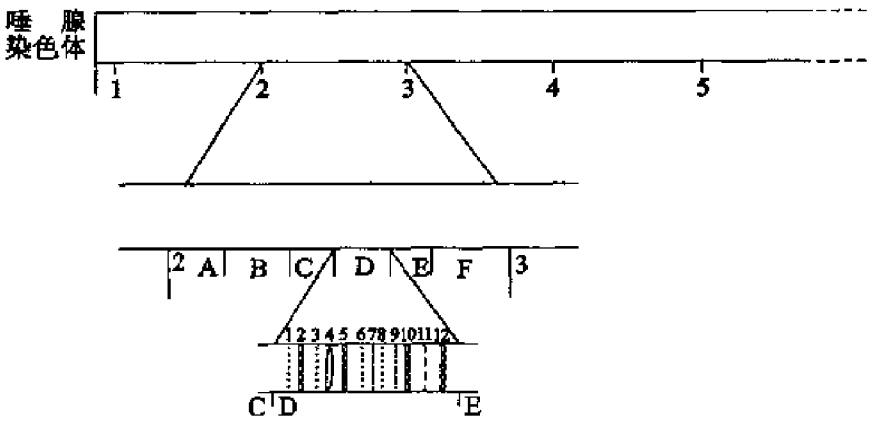


图5-2 唾腺染色体上的横纹分区示意图

这样可以清楚地描述每根染色体上的横纹，只要它起了变化，我们就可以马上辨认出发生改变的确切部位。

正常果蝇的眼为卵圆形，决定这个性状的基因在唾腺染色体Ⅰ（即性染色体）上。经过研究，卵圆形眼是由唾腺染色体Ⅰ上16大区A区中的6条横纹决定的。如果A区的这6条横纹重复一次，加倍成为12条，那么它们所决定的眼形将不是卵圆形的而是棒眼。如果A区的6条横纹重复二次，变为18条横纹，果蝇的眼睛将变为加倍棒眼，眼形比棒眼更狭小得多了（图5-3）。

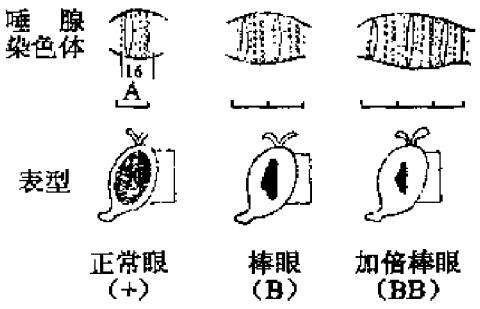


图5-3 唾腺染色体重复与棒眼的形成

果蝇里的另一个突变种叫做翅缺刻，它的翅膀边缘上有缺刻。这个不正常性状的发生是由于唾腺染色体Ⅰ上的第3大区的C区中的第1～11条横纹缺失而引起的。

由上面的实验说明，果蝇的眼形及翅形性状的改变是染色体改变的结果，这就证实了决定生物性状的遗传物质存在于染色体之中。

二、DNA是遗传物质

染色体的组成成分大致可分为三大类，即脱氧核糖核酸（DNA）、蛋白质和少量核糖核酸（RNA），它们中间哪些成分是遗传物质可以通过细菌转化实验来证实。

肺炎球菌按其有无荚膜可分为S型和R型。S型的球菌具有多糖组成的荚膜，它们形成的菌落周边是光滑的，并且有毒性。R型球菌不具荚膜，无毒，它们所形成的菌落周边是粗糙的。1928年英国医生F. Griffith做了以下实验（图5-4）。

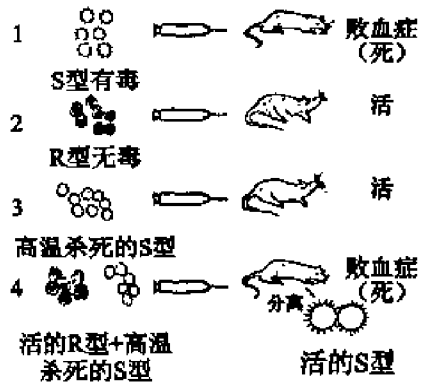


图5-4 小鼠体内的转化实验

他把由加热杀死的光滑SⅡ和粗糙RⅠ的细胞一起注射到小家鼠体内，几天后引起小家鼠的死亡。从小家鼠的尸体内取出的肺炎球菌中有SⅢ型的活细胞。在对照实验中，单独注射RⅠ或加热杀死的SⅢ品系时，小鼠并没有死亡。这些实验结果指出，活的SⅢ的出现是由于两个品系，即死的SⅢ受RⅠ的某种影响复活起来。从一般生物学知识来看，这是不可能实现的过程。另外一种可能性则是杀死的SⅢ型细菌给与RⅡ型细菌某种物质影响，使RⅡ细胞转化成活的SⅢ细菌。当然这种影响物质是具有遗传因子特性的。因为转变的细菌具有SⅢ型的特性，都是由这个影响物质所传递，所以这一种可能性的假设是现实的。但限于当时的科学水平，研究者不能具体用实验来证实转化现象的机理和这种影响物质究竟是什么。直到1944年，Arery和他的合作者重复了Griffith的实验，并进一步对使无毒细菌变为有毒细菌的转化物质进行了分离和化学上的鉴定。他们经过实验有力证明了DNA是SⅢ型细菌提取物中惟一有转化能力的物质。SⅢ型细菌的DNA具有SⅢ型的遗传特性，它不但使RⅠ型细菌转化为SⅢ型细菌，并能把SⅢ型细

菌的特性保持在后代中，由此可见，DNA 引起遗传性状改变的事实成为DNA 是遗传物质的直接证据之一。

另一个直接证明DNA 是遗传物质的是噬菌体感染实验(图 5-5)。

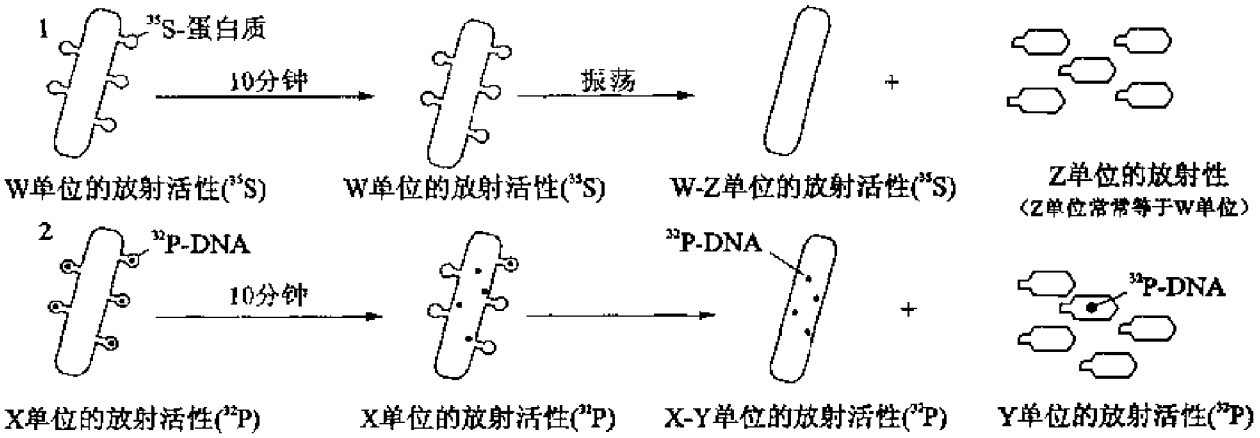


图 5-5　用放射性^{35}S 和^{32}P 示踪实验证明：噬菌体感染大肠杆菌后，只有噬菌体的DNA 进入菌体内，蛋白质外壳留在菌体外

噬菌体能对细菌进行感染，它比细菌小得多，只能用电子显微镜才能看到。感染大肠杆菌的噬菌体是由蛋白质组成的外壳，它分为多角形的头部和管状的尾部。头部外壳包裹着一条DNA 分子；管状的尾部具有收缩能力，是用以附着细菌的。

把大肠杆菌分别放在含有^{35}S 和^{32}P 的培养基中进行培养，产生含有^{35}S 和^{32}P 的大肠杆菌，使噬菌体感染有^{35}S 的大肠杆菌，那么由此产生的新的噬菌体的蛋白质外壳都有含^{35}S 的大肠杆菌。大约10 min后，用振荡器把在细菌外部的噬菌体的外壳都振荡下来，然后计量一下脱落外壳上的^{35}S 的放射剂量，发现它与原先感染细菌的噬菌体所带的^{35}S 的总放射量相似。同样，用含有^{32}P 的噬菌体感染不含^{32}P 的大肠杆菌，10 min后，用振荡器把附着在细菌表面上的噬菌体外壳都震荡脱落下来后，再测量被感染的大肠杆菌中所含的^{32}P 的放射总剂量，表明它与原先感染细菌的噬菌体所带的^{32}P 的放射总剂量是相似的。以上试验证明了噬菌体的蛋白质外壳没有进入细菌体内，只有DNA 进入到细菌的细胞中去。

1952 年，Hershey 用含有示踪原子^{32}P 和^{35}S 的培养基去培养大肠杆菌，由它产生的噬菌体的蛋白质外壳含有^{35}S，它的DNA 分子则含有^{32}P。用这种噬菌体去感染不含有^{32}P 和^{35}S 的大肠杆菌，确定了^{32}P 基本上都进入了细菌细胞，而^{35}S 都留在细菌外面，不进入细菌体内。蛋白质外壳吸附在细胞的表面上，用组织振荡器震动处理，使外壳从细胞表面掉下来留在悬浮液中。震荡处理不会伤害细菌，在这些细菌中的噬菌体还是正常增殖。所有新增殖的噬菌体的蛋白质外壳都不带^{35}S，但它们之中有些个体DNA 带有^{32}P。这些带^{32}P 的DNA 即进入大肠杆菌的亲代DNA。以上实验证明，新的不带^{35}S 的蛋白质外壳的生成完全是由带有^{32}P 的亲代DNA 决定的。由此可见，DNA 是遗传物质而不是蛋白质。

三、RNA 也是遗传物质

我们已经知道，有的病毒含有DNA，有的病毒含有RNA，那么后者病毒中，遗传信息是

否储存在RNA 分子中呢？德国的Schramm 和美国的Fraenkel-Connat 通过用烟草花叶病毒(TMV)进行感染实验对这个问题给予了回答。

烟草花叶病毒是杆状的，它的直径为18 nm，长度为300 nm。它是一个由2 130 个蛋白质亚基构成的外壳，环绕着一个RNA 分子核心。这种病毒不含有DNA，约含有6%的RNA 和90%的蛋白质。把TMV 病毒体在水和苯酚中震荡(此法使蛋白质变性)，就可以把病毒的蛋白质外壳和RNA 分开来。分开的蛋白质外壳和RNA 分子又能够重新组合成为有感染能力的完整的TMV 病毒。我们可以分别用蛋白质和RNA 对烟草叶子进行感染，结果表明：单是用病毒的蛋白质感染烟草，它不能使烟草生病；单是用病毒的RNA 感染烟草，可以使烟草生病，而所生的病斑和病毒引起的病斑一样。如果用RNA 酶处理，则RNA 失去了感染能力。这些都表明遗传信息是在RNA 上，与蛋白质无关。实验证明，分离出的TMV 的RNA 本身是非常不稳定的，但它可以和同种病毒蛋白质结合使自身稳定起来，其侵染能力也随之加强。TMV 的 RNA 对相近的蛋白质也是这样，如它与车前草病毒(HRV)的蛋白质组合具有同TMV 蛋白质组合同样的结果。

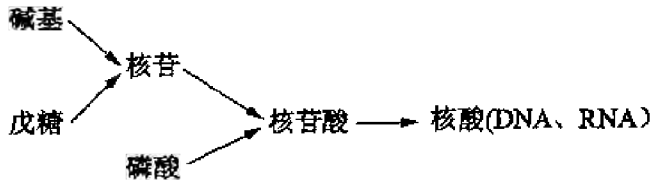
HRV 病毒能感染烟草，当然它的 RNA 也能感染烟草，倘若加上 TMV 的蛋白质与该RNA 结合，使它得到稳定，那么侵染能力也显著地增强了。如此，经过不同的组合实验，我们就可以得到两种组合的病毒品系，它们各具有一种品系的 RNA 和另一种品系的蛋白质，亦即由TMV 的RNA 和HRV 的蛋白质组合的病毒和由TMV 的蛋白质与HRV 的RNA 组合的病毒。当用具有TMV 的RNA 和HRV 的蛋白质组合的病毒感染烟草叶时，由此而产生的病斑都是TMV 病毒类型的。同样，用具有HRV 的RNA 与TMV 的蛋白质组合的病毒感染烟叶时，则产生HRV 病毒类型的病斑。由此看来，病斑的遗传信息不是由蛋白质所传递，而是由RNA 来传递的。

根据以上这些实验，我们可以得出结论：核酸是遗传物质。绝大多数生物以DNA 为遗传物质，只有少数的病毒以 RNA 为遗传物质。从这意义上来说，DNA 是主要的遗传物质。

近年来，由于科学技术的发展，人们发现线粒体和质体内具有DNA 分子，许多实验都证实了这一点。细胞器内DNA 的发现为细胞的遗传现象提供了物质基础，这将为我们了解细胞质遗传及核质相互作用对决定细胞性状的实质敞开了大门。

第二节　碱基、核苷和核苷酸

自然界中的核酸有两种类型：脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。它们的基本结构单位都是核苷酸。核苷酸由磷酸和核苷组成，而核苷又由碱基和戊糖组成，其关系如下所示：



DNA 和RNA 的具体组成及区别见表5-1。

表5-1 两类核酸的基本化学组成

	DNA	RNA
嘌呤碱	腺嘌呤 鸟嘌呤	腺嘌呤 鸟嘌呤
嘧啶碱	胞嘧啶 胸腺嘧啶	胞嘧啶 尿嘧啶
戊 糖	*D*-2-脱氧核糖	*D*-核糖
磷 酸	磷 酸	磷 酸

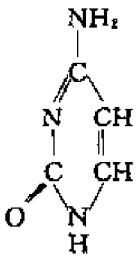
一、核酸组成单位的基本结构

1. 碱基

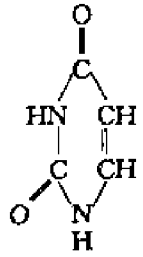
核酸的碱基有两类：嘧啶碱基和嘌呤碱基。

(1)嘧啶碱

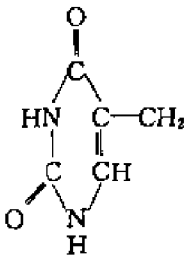
核酸中常见的嘧啶碱有三种：胞嘧啶(C)、尿嘧啶(U)和胸腺嘧啶(T)。胞嘧啶存在于DNA 和RNA 中。胸腺嘧啶一般只出现于DNA 中，不过某些tRNA 中也含有少量的胸腺嘧啶。尿嘧啶仅存在于RNA 中。



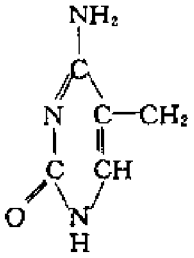
胞嘧啶



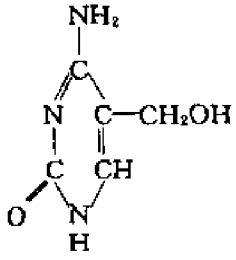
尿嘧啶



胸腺嘧啶
(5-甲基尿嘧啶)



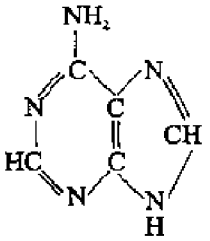
5-甲基胞嘧啶



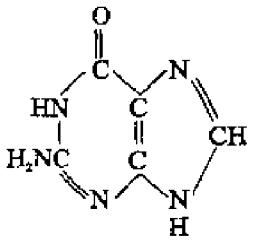
5-羟甲基胞嘧啶

(2)嘌呤碱

无论是DNA 还是RNA，组成核酸的嘌呤碱均有两种：腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)。

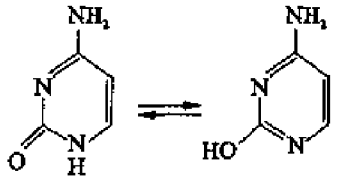


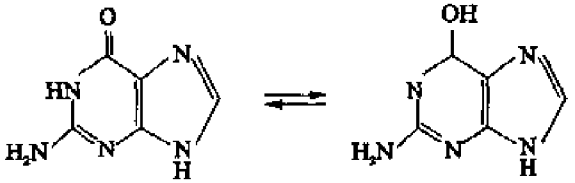
腺嘌呤



鸟嘌呤

上述碱基在溶液中可能以酮式和烯醇式两种互变异构体的形式同时存在，不过在核酸结构中主要为酮式。



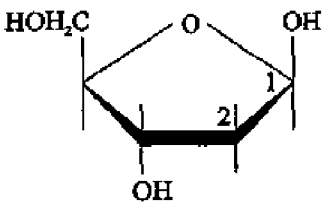


lactam
(keto)
（酮式）

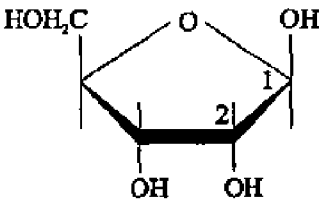
lactam
(neto)
（烯醇式）

2. 戊糖

核酸中的戊糖都取呋喃型环状结构形式。参与DNA 组成的戊糖为*D*-2-脱氧核糖，参与RNA 组成的戊糖为 *D*-核糖。



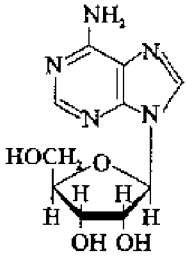
β-*D*-2-脱氧核糖

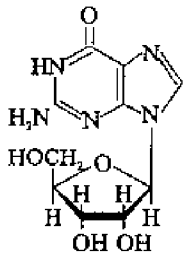


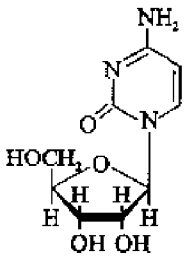
β-*D*-核糖

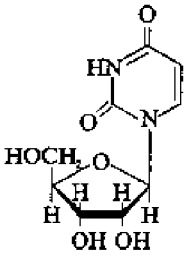
3. 核苷

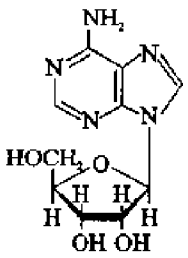
核苷是戊糖和碱基通过N—C 链缩合而成的糖苷。X 衍射分析表明，糖环平面和碱基平面互为直角。

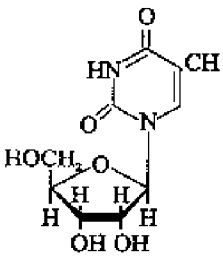

腺苷


鸟苷


胞苷

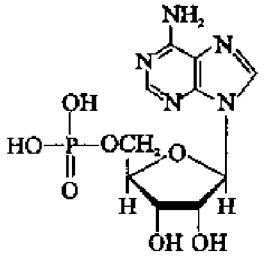

尿苷

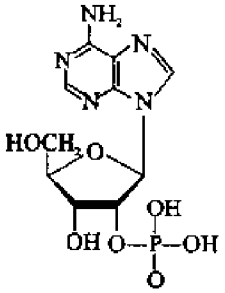

脱氧腺苷

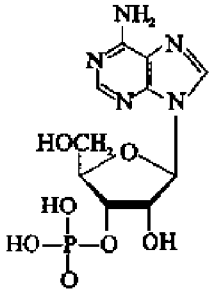

脱氧胸苷

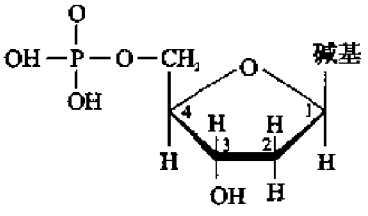
4. 核苷酸

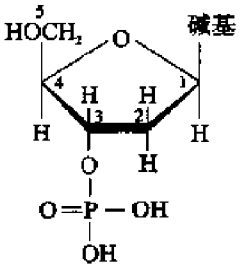
核苷酸是戊糖羟基被磷酸酸化而形成的核苷磷酸酯。核糖核苷酸包括2′-,3′-和5′-三种类型。脱氧核糖核苷酸只有两种:3′-和5′-核苷酸。


5′-腺苷酸（pA）
(AMP)


2′-腺苷酸
(2′-AMP)


3′-腺苷酸(AP)
(3′-AMP)


5′-脱氧核糖核苷酸


3′-脱氧核糖核苷酸

在生物体内,核苷酸除了参与组成核酸外,也有一些具有特殊生理功能的游离核苷酸和核苷酸衍生物,其中一类是所谓的环化核苷酸,如cAMP(3,5-环化腺苷酸)、cGMP(3,5-环化鸟苷酸)。另一类是多磷酸核苷酸,如ADP、ATP、CDP、CTP、UDP、UTP、TDP及TTP等,它们分别为相应的碱基核苷二酸与碱基核苷三磷酸酯(如腺嘌呤核苷二磷酸、三磷酸等)。此外还有一些特殊的多磷酸核苷酸,如ppGpp和pppGpp,它们称为鸟嘌呤核苷四磷酸和五磷

酸酯。

和氨基酸一样，核苷酸分析也是生产实践与理论研究经常要进行的工作。同样，分析对象可能是单一成分，也可能是它们的混合物（如核酸的水解液）。对于前一种情况来说，通常只需要在特定的pH 条件下测定其紫外吸收光谱及特定波长如260 nm 或$\lambda_{最大}$的光吸收值，参考标准样品的光谱和消光系数就可进行定性鉴定和定量测定。当然对于未知成分有时还需考查它的层析、电泳性态和pK 值等。对于后一种情况来说，一般必须通过离子交换层析、纸层析或纸电泳等手段，先将它们加以分离然后进行测定。近年来已开始采用气相层析、高压液相层析、薄层层析等技术，特别是双向薄层层析技术，由于它快速而微量，所以更受人注意。

核苷酸代谢的意义主要是提供生物体内各种磷酸化物质，包括：核酸生物合成所需的核苷酸，糖、脂代谢的主要活化中间物如UDPG、CDP 二酯酰甘油，高能化合物如ATP，维生素辅酶如NADP、FAD，调节物质如cAMP，核苷酸类调味品和药物。核苷酸代谢与能量代谢关系不大。

二、核酸各组成单位的性质

1. 物理性质

核苷酸、核苷和碱基都能溶于水，不溶于乙醇等有机溶剂。不过，碱基和核苷在水中的溶解度一般不大，嘌呤衍生物比嘧啶衍生物更小，溶解度顺序是：胞嘧啶＞尿嘧啶＞腺嘌呤＞鸟嘌呤。核苷酸——特别是它的钠盐较易溶解于水。这些物质在水溶液中，尤其在中性和弱碱性溶液中一般很稳定，但嘌呤核苷和嘌呤核苷酸在酸性溶液中较易被破坏。

2. 光学性质

碱基具有共轭双键，它们和它们的核苷、核苷衍生物在 260 nm 附近表现出各自的特征吸收光谱。利用这些特点可对碱基、核苷和核苷酸等进行定性分析和定量测定。

3. 解离性质

嘧啶和嘌呤碱基的解离主要发生于杂环中的N 上，但是嘧啶碱的烯醇式羟基也能发生解离。戊糖的羟基虽能发生解离，但pK 值一般在12 以上。戊糖的存在能影响碱基的解离，降低碱基解离的pK 值，因而核苷的pK 值和相应的碱基有些不同。

核苷酸中的磷酸能发生解离。在单核苷酸中磷酸有 2 个解离基，在多聚核苷酸中只有 1 个。由于核苷酸中含有碱基和磷酸基，因此它们在一定的pH 条件下可形成两性离子。该离子的等电点由第一磷酸基的pK（pK_1）与碱基含N 环的pK（pK_2）决定：pI＝（pK_1＋ pK_2）/2。

第三节　核酸的结构、功能、性质及分离

核酸中含约15%～16%的N 和9%～10%的P（P 是核酸的特征元素），其他的元素成分是C、H、O。核酸用酸完全水解后，产生嘌呤和嘧啶碱、核糖（或脱氧核糖）和磷酸的混合物。核酸有强烈的紫外吸收，其最大吸收值在 254 nm 左右，而蛋白质的最大吸收在 280 nm 左右，利用这一特性可以鉴别核酸纯度及其制剂中的蛋白杂质。

核酸分成两大类，一类叫脱氧核糖核酸(DNA)，主要存在于细胞核内，另一类叫核糖核酸(RNA)。核酸是一切生物的遗传变异的物质基础，决定着生物的发展方向。核酸如此重要，这完全取决于核酸自身的结构特点，因此我们首先要熟悉一下核酸的结构。

一、DNA 的结构

1953 年Waston 和Crick 发现DNA 的双螺旋分子构象是生物科学发展史上的一个伟大事件，它深刻地影响着生物科学几十年的发展。今天我们对细胞遗传信息储存和利用的认识都是建立在这个发现的基础上。DNA 是一种十分庞大的生物大分子，在它的分于中蕴藏着无穷的奥秘。随着重组DNA 技术的建立和发展，以及人类基因组计划的完成和后基因组计划的实施，DNA 将逐渐被人们所了解和认识，并将最终揭开这一奥秘，造福人类。

1. DNA 的一级结构

生物信息贮存在DNA 分子中，而DNA 大分子主要由 4 种脱氧核苷酸组成，DNA 的一级结构就是指这些脱氧核苷酸在分子中的排列顺序(图 5-6)。

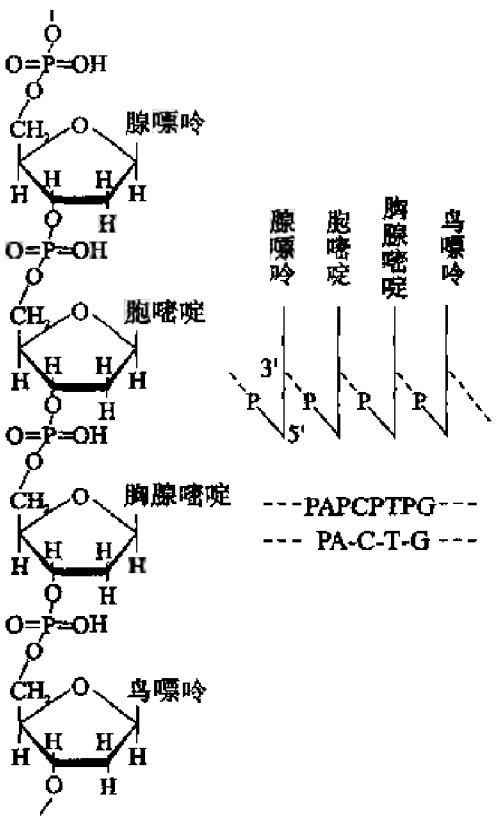
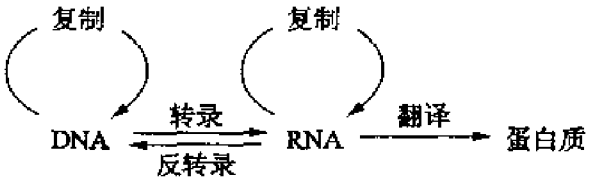


图 5-6　DNA 中多核苷酸链的一部分

单链DNA 分子的大小以碱基数量表示，双链DNA 分子的大小以碱基对(bp)数量表示。各种DNA 分子特有的碱基排列方式决定了它携带的信息及行使的功能。一切生物进行繁殖传代时都能保持自己的形态特征，这是由于各种生物都以自己所特有的次序进行生物体内的化学反应，生物体的各种成分都以该生物特有的量和质的规律被合成和分解。合成多种特

异蛋白质的信息来自生物体的遗传物质。遗传物质在DNA 的化学结构(核苷酸排列)之中，经转录后它被传递给mRNA，并以此信息为基础合成特异的蛋白质(这一过程也叫“中心法则”)，

中心法则：



因此，了解各种核酸中核苷酸的排列顺序，即DNA 的一级结构，是核酸化学及分子生物学领域中极其重要的部分。

另外，DNA 分子中的不同区域有不同的功能，有些是编码蛋白质的结构基因，有些是复制、转录或翻译等过程的调控信号。具有不同功能的DNA 区域在整个分子中分布的情况就是DNA 顺序组织的主题，也可以说是DNA 一级结构的另一个侧面。

DNA 分子中的磷脱氧核糖核苷之间的连接是通过3′,5′-磷酸二酯键的方式连接起来的，具体地说，就是一个脱氧核苷酸的磷酸既与自身脱氧核苷酸的戊糖上的第5′碳以酯键相连，又与另一个脱氧核苷酸的戊糖上的第3′碳以酯键相连，从而形成一个3′,5′-磷酸二酯键把两个脱氧核糖核苷酸聚在一起。这样，通过3′,5′-磷酸二酯键把许多一磷酸核苷逐个地连接起来，形成了一条多核苷酸长链。为方便起见，常用“线条式”来表示DNA 分子中多核苷酸链的结构，如图5-7。

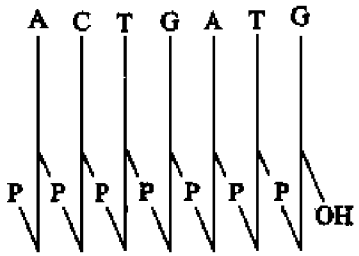


图5-7 多核苷酸链的结构“线条式”表示法

图5-7 中的垂直线表示糖分子的碳链，它在第一碳原子(C_1)处连接碱基。从垂直线中部画出的斜线表示第三碳原子(C_3)上的磷酸酯链，而从垂直不连接碱基的那一端画出的斜线则表示第五位碳原子(C_5)上的磷酸酯键。P 表示磷酸基因，A、C、G、T 表示碱基。

2. DNA 的二级结构——双螺旋结构模型

DNA 的水溶液是很粘稠的，加热又能使溶液粘度大大降低，这说明了DNA 分子具有一定结构。DNA 分子应该具有怎样的结构才能使它们的溶液有这种流体力学性质呢？20 世纪40 年代，Pauling 提出了蛋白质的α螺旋模型，同时人们已经知道DNA 是遗传信息的载体。那么DNA 应该具有怎样的结构才能成为基因的载体呢？1953 年，Waston 和Crick 二人提出了DNA 双螺旋模型，这个模型具有重大生物学意义。它不仅解释了当时所知道的DNA 的一切理化性质，而且将结构与功能联系起来，为细胞分裂期间遗传物质的复制提供了合理的解释，开创了分子生物学的新时期，大大推动了分子生物学的发展。

(1)双螺旋模型的依据

Waston 和Crick 在构建DNA 双螺旋结构模型的过程中，充分利用了有关DNA 研究的化学、物理学和生物学资料。下述三个方面的资料是他们所采用的主要的依据。

①Chargaff 的DNA 碱基组成等比规律

美国哥伦比亚大学的化学家 Chargaff 用水解和纸层析的方法分析了各种不同来源 DNA 的核苷酸组成，表明DNA 中4 种核苷酸存在的比例变化很大。同时，Chargaff 还注意到4 种碱基的相对比例并不是随机的，在所有DNA 样品中都有下述规律性：腺嘌呤的含量与胸腺嘧啶的含量相等，鸟嘌呤的含量与胞嘧啶的含量相等(A＝T，G＝C)，因此嘌呤的总数与嘧啶的总数也相等。$\frac{A+G}{T+C}=1$，这就是Chargaff 规律。

②碱基和核苷酸的结晶学资料

对核酸组成成分的结晶学和物理化学研究结果确定 A—T、G－C 之间可配对形成氢键，无论是从化学上还是从结构上来分析全是合理的。嘌呤和嘧啶碱基有互变异构体，但是碱基上某些氢原子并不是随机地在环的氮原子或氧原子上移动，它们有各自最喜取的位置。连接在嘌呤和嘧啶环上的氢原子主要取氨基，而不是亚胺基。鸟嘌呤和胸腺嘧啶 C_6 上的氧原子喜取酮式，而少取烯醇式。碱基选取这些结构促使 A—T 和 G—C 配对。若两个嘧啶配对，则几何形状太小，两个嘌呤配对则几何形状又太大，为双螺旋所容纳不下，只有 A—T 碱基对的几何形状正适合双螺旋的大小。

③DNA 纤维的X 射线衍射分析

1950 年，Wilkis 和 Franklin 提供了精美的高质量的 DNA 纤维 X 射线衍射图。照片说明，DNA 有螺旋结构，而且它由 2 条或 3 条多聚核苷酸链组成。

(2)双螺旋模型的特征

在综合了碱基的理化性质、在DNA 中的组成情况以及 DNA 纤维 X 射线衍射分析结果的基础上，Watson 和 Crick 于 1953 年提出了 DNA 是靠两条多聚核苷酸链上方向相反的碱基之间的氢键维系而成的有规则的双链螺旋结构模型。该模型有下述特点：

①DNA 双链的反平行

DNA 由两条成反平行的多核苷酸链环绕一个共同的轴旋绕形成双螺旋，一条链上的 3—OH 端与另一条链的 5－P 相邻，因此，双螺旋的两个末端在化学上和结构上是一样的，两条链均为右手螺旋。由脱氧核糖和磷酸基组成的主链处在螺旋的外侧，嘌呤和嘧啶碱基处于螺旋的内侧(图 5-8)。

以后，Kornberg 通过碱基最近邻频率的分析证明双链核酸的两条链都是反平行的。

②碱基互补配对

脱氧核糖环和磷酸基交替而成的两条DNA 主链像一个转梯的两条扶手，嘌呤—嘧啶碱基对就是梯级。只有在A 与T 配对、G 与C 配对时，DNA 螺旋的两条链才能吻合。核苷酸晶体分析证实在A—T 和G—C 间存在氢键。其中，G—C 成氢键只取一种形式，也许是因为形成三个氢键的结构非常稳定的缘故。在A—T 之间可取不同方式形成氢键，但在DNA 双螺旋结构中均取Waston-Crick 碱基对的形式。A—T 间形成2 个氢键，G—C 间形成3 个氢键。

碱基成对有一定的规律：A 一定与 T 成对，G 一定与 C 成对。因此，有 4 种可能的碱基对，即A—T、T—A、G—C 和C—G。由于四种碱基对的大小几乎相同，所以无论碱基顺序如何，双螺旋DNA 分子整个长度的直径相同。

碱基互补配对是DNA 双螺旋结构的主要特征，只要一条链上的碱基顺序确定后，另一

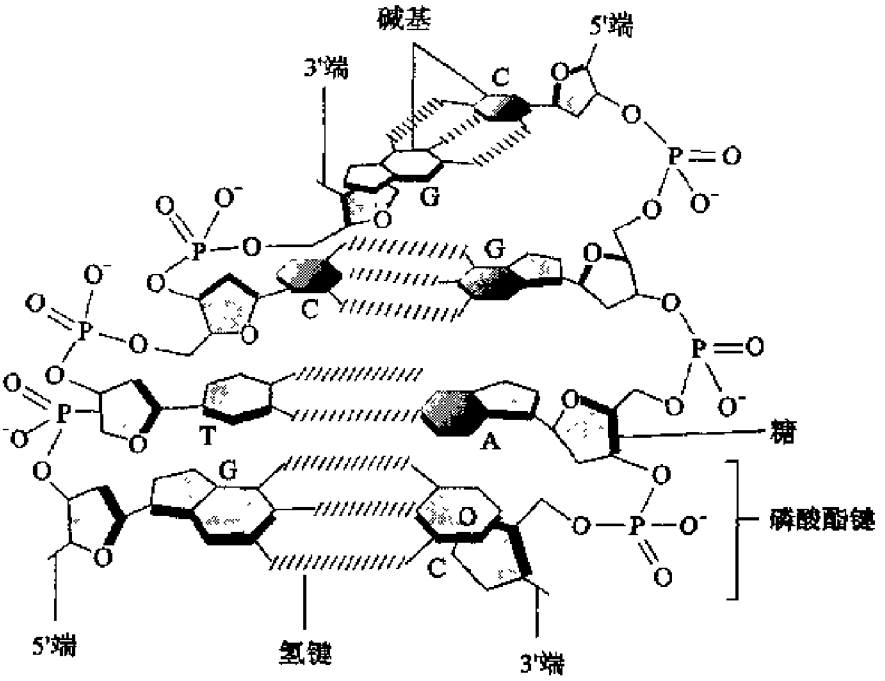


图 5-8　DNA 的结构

条互补链的碱基顺序也就随之被决定了。这种互补关系在DNA 分子复制过程中极其重要，它构成了分子生物学中心法则的基础。

③大沟和小沟

观察双螺旋结构时可以看到配对的碱基并没有充满螺旋的空间。由于碱基与糖环连接不是在碱基对的相反两侧而是在同侧，因此，碱基对与糖环不对称的连接导致双螺旋表面形成两个凹下去的沟，一条宽的称为大沟，另一条窄的称为小沟。沿着碱基对的边，与两个糖环连接点之间的夹角小于180°的一侧是小沟边，与两个糖环连接点间的夹角大于180°的一侧是大沟边。

④DNA 双链的极性

DNA 双螺旋中的二条核苷酸链的走向是相反的，每条链的走向也即链的极性。核苷酸链的走向取决于核苷酸的磷酸二酯键的走向。如果一条链的磷酸二酯键是从一端的脱氧核糖上的5 碳开始的，那么在该链的另一端一定是在最后一个脱氧核糖上的3 碳上有一个自由的羟基，而另一端的脱氧核糖的 5 碳上有一个自由的磷酸根，我们通常称这个链的走向是3→5。相反，它的互补链中的磷酸二酯键则是从一端的脱氧核糖3 碳上开始，在另一端的脱氧核糖 5 碳上结束，因此，它的走向为 5→3。如果同用 5→3 走向来标明DNA 二条核苷酸链的极性，那么它们的走向恰恰是相反的。

(3)DNA 二级结构的稳定因素

①氢键

碱基对之间的氢键是N—H 和N—H……O 类型，它们在维系DNA 双链结构中有重要的作用。DNA 中A—T 与G—C 间的特定的Waston-Crick 碱基对相互可形成氢键的原子间距离与一般氢键的键长一致。其中，供体、氢原子和受体原子处于一直线，利于形成氢键。同时，

这种碱基配对也确保了两条主链糖苷键之间的距离的一致性。氢键有助于DNA 复制及信息传递过程中双链的打开，有助于选择正确的碱基合成新生核酸链并趋于形成正常的三维结构。

②碱基堆积

碱基堆积对维持DNA 的二级结构起主要作用，它是碱基对之间在垂直方向上的相互作用。碱基堆积力是由芳香族碱基π 电子间的相互作用引起的。当碱基堆积成有规律的结构时就形成了疏水核心，这使得双螺旋内部不存在游离水分子，有利于互补碱基间形成氢键。由于碱基在DNA 键中是相连的，堆积力使多核苷酸链比较刚硬，DNA 表现出比较伸展而不是任意线团的状态。大量的氢键显然可以稳定DNA 的结构，但是氢键太弱，所以现在普遍认为堆积碱基间的疏水作用(即碱基堆积力)是稳定 DNA 结构更重要的因素。

③离子键

双螺旋外侧带负电的磷酸基团同带正电核的阳离子之间形成的离子键可以减少双键之间的静电斥力，因而对 DNA 双螺旋结构也有一定的稳定作用。与 DNA 结合的阳离子如 Na^+、K^+、Mg^{2+}、Mn^{2+}，在所有类型的细胞中都很多。

(4)双螺旋结构的构象变异

Waston 和Crick 根据DNA 纤维X 射线晶体衍射图及其他实验资料提出了DNA 为右手双螺旋结构的科学假设。随后的研究表明，Waston 和Crick 提出的DNA 构象是DNA 分子最为常见的构象，通常称为B 型DNA。但是，大量的研究资料表明，DNA 分子的结构不是固定不变的，不同的环境因素如平衡离子类型、离子强度、特异结合蛋白等的存在与否以及DNA 分子碱基的组成都可促使 DNA 分子形成不同的构象(图 5-9)。

因此，细胞的DNA 分子事实上存在着不同的二级结构的动态变化。生物体内核酸结构的动态变化，正是其发挥生物学功能所必需的。

①右手双螺旋DNA 结构

a. B 型DNA 的结构(图 5-10)

这种结构的要点如下：(a)两条右手螺旋的多核苷酸链环绕同一中心轴盘绕。(b)两链是反平行的，即一条链是5 端在上、3 端在下，另一条链是3 端在上、5 端在下。(c)两条链的磷酸—核糖主链在外，碱基在内。碱基平面相互平行叠加，与中心轴垂直。每个碱基平面距离为 0. 34 nm。(d)螺旋转一圈要10 个碱基，螺旋距为3. 4 nm。(e)两条链相对的碱基存在A＝T、C＝G 的互补关系，彼此靠氢键相互作用。G/C 对之间有3 个氢键，而A/T 对之间仅有2 个氢键。(f)在DNA 双螺旋分子上交替存在着大沟和小沟。(g)C 和G 核苷酸中核苷酸键是反式构型，脱氧核糖折叠是 C_2 在内。

b. A 型DNA 结构

在不同的条件下，DNA 有不同的构象，呈现结构的多态性。Watson 和 Crick 在分析 DNA 的双螺旋结构时就注意到存在2 种构象状态A 和B，但他们认为B 型DNA 是含水更多的DNA，是具有主要生物学意义的构象，因此很长一段时间里人们很少注意B 型DNA 以外的DNA 构象的存在。

A 型DNA 同B 型DNA 一样，也是右手螺旋结构，具有共同的基本特征：(a)两条链环绕同一中心轴盘旋；(b)两条链反平行；(c)两条链上的碱基以A＝T 和C＝G 互补配对，并以氢

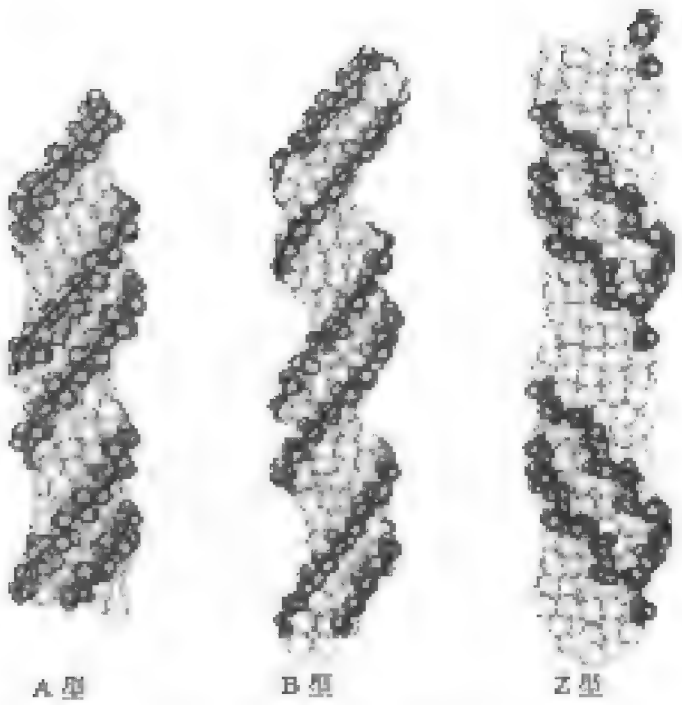


图 5-9　A-DNA、B-DNA、Z-DNA

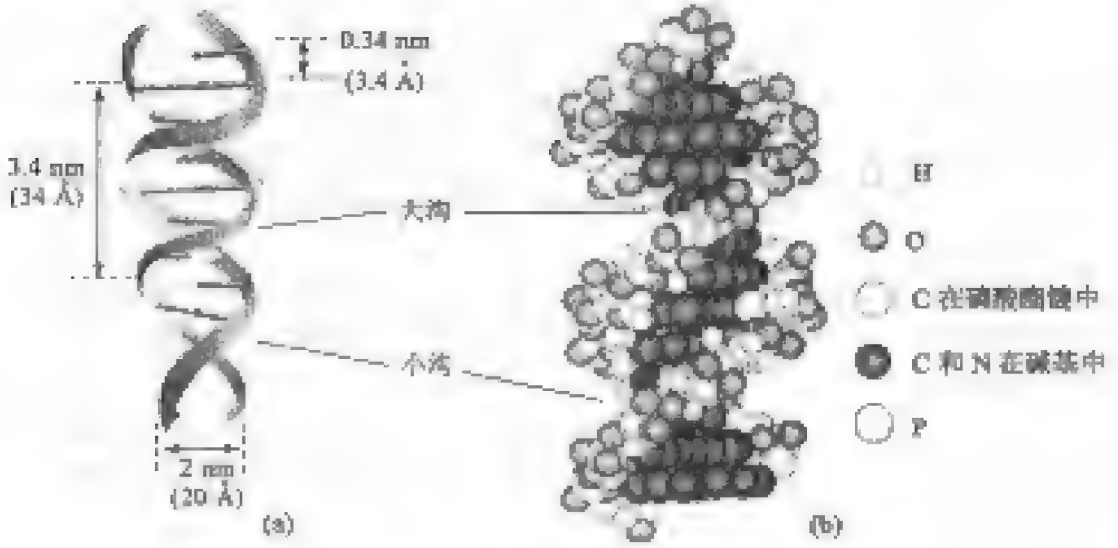


图 5-10　DNA 结构的两种模型

键相互作用；(d)C 和 G 的糖苷键也是反式构型。

但 A 型和 B 型 DNA 也存在着一些明显的差别：(a)A 型 DNA 更紧密，每个碱基平面距离为 0.256 nm，每圈螺旋有 11 对碱基，螺距为 2.8 nm；(b)C 和 G 之间核苷酸中脱氧核糖的折叠不同，A 型 DNA 是 C_3 在内，B 型 DNA 是 C_2 在内；(c)碱基的方向有细微的差别，导致大沟和小沟也有细微的差别。

②左手双螺旋DNA 结构——Z 型DNA 结构

1979 年，Wang 和 Rich 等在用 X 射线晶体衍射法分析人工合成的 DNA 小片段 d(CGCGCG)的晶体时，发现它是一个左手双螺旋结构，称为Z 型DNA(Z-DNA)。同A 型和B 型DNA 一样，它也由两条反平行的链组成，两条链的碱基靠碱基间的氢键配对相互作用，但同A 和B 型DNA 不同的是其螺旋旋转的方向相反，呈左手螺旋。Z-DNA 结构的主要特征是：(a)糖—磷酸主链的走向呈"之"字形，分子呈左手螺旋构象；(b)Z-DNA 较B-DNA 细而"舒展"，螺旋直径为1.8 nm，每个碱基平面的距离是0.37 nm，每一螺旋圈含12 对碱基，螺距为4.5 nm；(c)鸟嘌呤碱基绕糖苷键旋转呈顺式构型，而胞嘧啶碱基仍和B-DNA 相同，是反式构型，Z-DNA 的糖环折叠是 C_3 在内，而B-DNA 是 C_2 在内；(d)Z-DNA 仅有一条小沟，且较深，含有较高负电荷密度。

表 5-2　几种DNA 螺旋主要构象的参数

螺旋类型	每圈螺旋中的碱基对数	碱基旋转的角度(°)	每个碱基对的垂直高度(nm)	螺距(nm)	旋直径(nm)
A	11	+32.7	0.256	2.8	2.3
B	10	+36.0	0.338	3.4	2.0
C	12	−30.0	0.371	4.5	1.8

3. DNA 的三级结构

双螺旋DNA 分子在细胞内并不是以细长的链状高分子的自由状态存在。DNA 具有柔韧的结构，它周围的离子环境和与DNA 形成复合物的DNA 结合蛋白质的性质决定了它具有更高级的结构形式。DNA 双螺旋的进一步扭曲就构成三级结构。核酸的三级结构包括线状双链中可能有的扭结和超螺旋，多重螺旋和分子内单链形成的环以及环状DNA 中诸如结、超螺旋和连环之类的各种拓扑学状态。其中超螺旋是最常见的三级结构。

(1)三股螺旋结构

在特定环境中(如低pH 下)，聚dA 链首先与一条聚dT 链互补形成双螺旋，然后另一条dT 链再同双螺旋通过Hoogsteen 氢键形成三股螺旋结构。形成三股螺旋结构的DNA 称为H-DNA(图5-11)。

H-DNA 的形成取决于非共价碱基对即Hoogsteen 碱基对的形成，而这种碱基对的形成不会影响双螺旋中的Watson-Crick 碱基对。H-DNA 可能在基因重组中起作用。

(2)超螺旋

超螺旋，简单地说就是螺旋的螺旋，或者我们假定双螺旋中存在一个中心轴，这条中心轴再形成螺旋。超螺旋的形成不是一个随机过程，而是在DNA 双螺旋存在一种结构张力时才会形成。由于DNA 双螺旋的盘绕过度或不足，使DNA 分子处于一种张力状态。在封闭环状DNA 分子中，这种张力不能释放出来，就会形成超螺旋。超螺旋结构是以DNA 处于闭合环状为先决条件的。

将一线型DNA 分子放在平面上，当将其两端均固定时，DNA 分子便形成闭环。由于这一分子形成闭环时没有过度盘绕或盘绕不足，因此称为闭环DNA 的松弛态。如果使正常的DNA 额外的捻紧螺旋或放松螺旋，DNA 就会受到张力。在DNA 链末端开放的情况下，这些

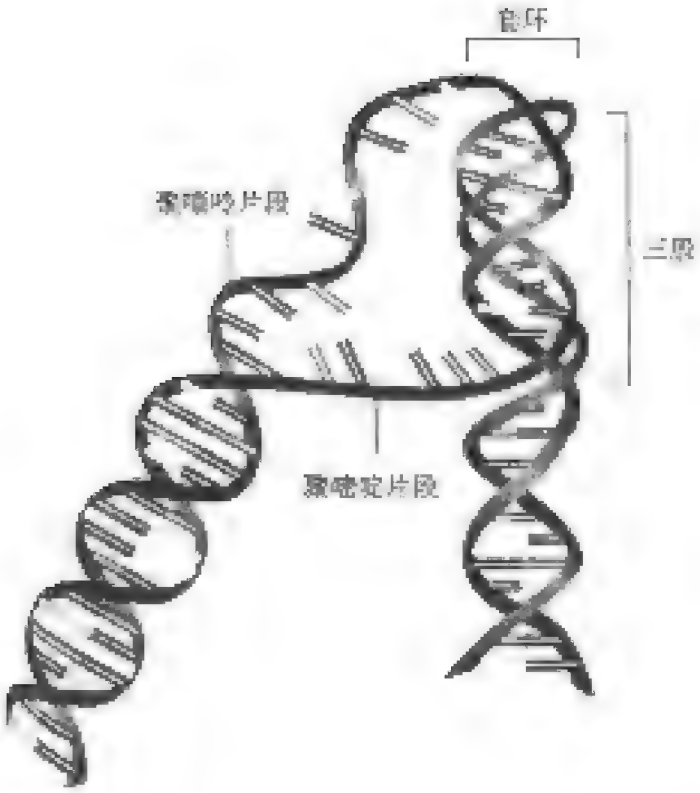


图 5-11　H-DNA 的结构

张力经过链的转动可以除去，使DNA 又恢复到松弛状态。但是在末端闭合的情况下，增加或减少螺旋数，产生的张力会使DNA 分子发生扭曲。假定在DNA 两个末端闭合前，将解开双螺旋，再把末端连接起来，未堆积的碱基对将自发的再趋于聚集成通常的双螺旋构象。由于没有游离末端，它们不可能沿着双螺旋互绕，惟一的可能是整个环状分子旋转扭曲来补偿引进的张力，结果形成右手超螺旋，又称负超螺旋。假定末端闭合前，线状DNA 螺旋捻得更紧，得到的闭环DNA 为维持B-DNA 结构的倾向而趋于解旋，结果产生了左手超螺旋，也称为正超螺旋。DNA 分子扭转的数量等于原来变化的螺旋量。

(3)超螺旋状态的定量描述

为了描述闭合环的超螺旋状态建立了下述方程：$L=T+W$

式中 L 是拓扑环绕数，指在DNA 中一条链绕另一条链的总次数，或者说把一个环放在平面上，另一个环跨过这个平面的次数。L 是一个整数，只要没有发生化学键的断裂，在闭合环状DNA 的任何拓扑学状态中它的值保持不变，即右手螺旋时 L 取正值。T 是双螺旋的圈数，右手螺旋时取正值，在无张力的松弛状态下，拓扑环绕数等于双螺旋的圈数，即 $L=T$，DNA 成平面环。W 是超螺旋数，描述右手超螺旋时用负值，左手超螺旋时用正值。在闭环中，L 值不变，T 和 W 依DNA 三维结构不同而取不同的值。例如一个无应力、松弛的B-DNA 有 420 bp 组成，一条链绕另一条链 42 次，形成 42 圈螺旋，因此 $L=T=42$，$W=0$。如果捏紧左端，使双螺旋部分解开 6 圈，则 L 和 T 全减到 36。放松左端，让链转开后，又连接，可形成一个松弛环状，$L=T=36$，$W=0$。若解开 6 圈螺旋后，不让链松弛就使它连成闭环。由于DNA

趋于回复到B-DNA，因此T又变成了最初的12，而L－36，于是W＝－6，形成了6个负超螺旋（右手螺旋）。

当DNA盘绕不足时（T>L），中心轴的盘绕同双螺旋两条链盘绕的方向相同，形成负超螺旋以此来释放张力（W是负值）；当DNA盘绕过度时（L>T），中心轴的盘绕同双螺旋两条链盘绕的方向相反，形成正超螺旋，通过这样来释放张力（W是正值）。当DNA是负超螺旋时，它通常围着自身缠绕并形成向内绕的超螺旋结构（图5-12）。

图5-12　形成超螺旋的两种主要形式

当DNA围着一个蛋白质核盘绕形成超环面的超螺旋时，通常形成正超螺旋的DNA。

当一个负超螺旋DNA分子被放到平面上时，T便减小到与L相等，这样通过形成负超螺旋而释放的张力又产生（图5-13）。

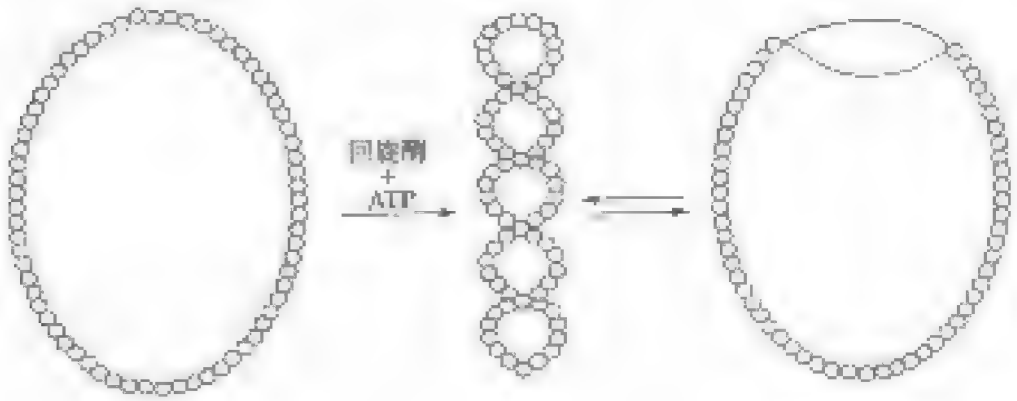


图5-13　张力对环状DNA产生的作用

在复制过程中，拓扑异构酶便切断DNA来释放张力，使DNA复制过程能顺利进行。超螺旋可能在两方面的生物学意义：①超螺旋DNA比松弛型DNA更紧密，使DNA分

子体积变得更小，易于包装在细胞内；上超螺旋能影响双螺旋的解链程度，因而影响DNA分子与其他分子如酶、蛋白质分子的相互作用。

(4)生物体内的超螺旋结构

①染色体

含有遗传单元基因的DNA被压缩成叫染色体的结构。染色体是染色质在细胞分裂期中经过紧密缠绕、折叠、凝缩和精细包装形成的具有固定形态的遗传物质的存在形式。

在原核生物如大肠杆菌中的染色体的结构，见图5-14。

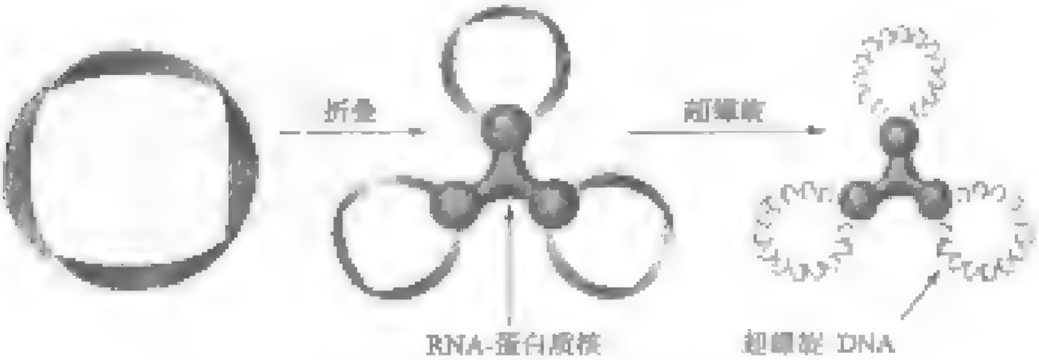


图5-14　大肠杆菌的染色体

染色体是环状DNA分子，它高度缠绕。大肠杆菌染色体被认为包含有与RNA-蛋白质核心相连的超螺旋DNA。聚胺类（聚阳离子，如亚精胺和精胺）有助于染色体高度压缩结构的形成。

相对于原核生物，真核生物中的基因组更加复杂。对于不同的物种，真核细胞中染色体的长度和数量也不同。例如：人的细胞中有23对染色体，大约有3亿对碱基；果蝇有4对染色体，1.8亿对碱基；而谷物中只有10对染色体，却有6.6亿对碱基。另外，每条真核生物染色体都含有两个结构单元：着丝粒和端粒。着丝粒是DNA序列中AT富集区，它与非组蛋白质缔连并形成动原体，在细胞分裂中，动原体与纺锤纤维相互作用。端粒是染色体末端的DNA中的CCCA重复区，它在DNA的复制中起阻止编码序列丢失的作用。

每一个真核生物染色体均含有一个线型DNA分子与蛋白质结合形成的核酸组蛋白。组蛋白是一类碱性蛋白质，根据所含碱性氨基酸的比例的不同，组蛋白可分为H_1、H_{2A}、H_{2B}、H_3和H_4五类。在所有真核生物细胞中，组蛋白质的初级结构基本相似。然而，不同物种的组蛋白以及在细胞循环的不同阶段，组蛋白是不同的，它们不同程度地进行化学修饰（如磷酸化、乙酰化、甲基化以及ADP核糖基化）。这些化学修饰的重要意义目前正在研究中。将组蛋白与DNA相结合则产生核小体，它是真核生物细胞中染色体的结构单元。

②核小体

当真核生物细胞不进行细胞分裂时，染色体部分解压缩形成染色质。染色质在电子显微镜中呈念珠状。每一个念珠是一个核小体，它的中心是由H_3及H_4各两分子结合成的四聚体，其两侧各与一个由H_{2A}与H_{2B}结合成的二聚体相连，整个成为一个八聚体。八聚体周围被双螺旋DNA缠绕7/4圈而成为"念珠"状结构，其缠绕组蛋白八聚体的DNA大约为

150 bp，另外还有 60 bp 的裸间或线型DNA 连接各个相邻的核粒(图 5-15)。

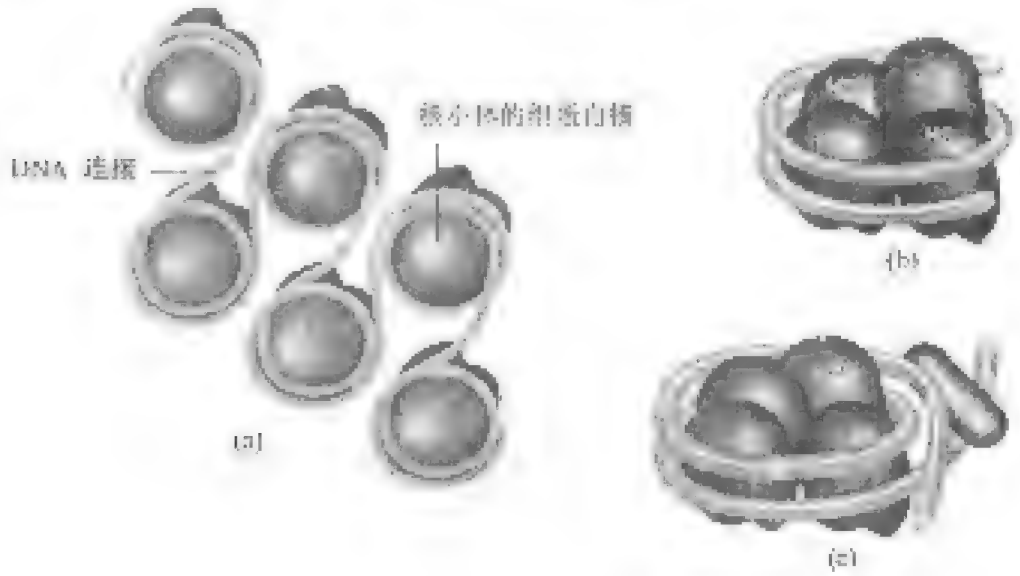


图 5-15 染色质和核小体

当染色质被压缩形成染色体时，核小体便缠绕成更高级的结构，称为 30 nm 纤维。它可进一步缠绕形成 200 nm 的丝状体，其三维结构还不清楚，但是它被认为含有无数超螺旋的环，与被称为核支架中心蛋白质的复合物相连。有关真核生物细胞中的染色体的整个结构组织还未被阐明，但是它很可能含有多级超螺旋结构。

已证明，真核生物细胞染色体中的遗传信息组织比原核细胞中的复杂的多，它们的基因组有许多不同的地方，表现在如下几个方面：①基因组大小；②编码功能；③编码连续性。

二、DNA 的生物学功能

DNA 是绝大多数生物的遗传信息储存物质，所以 DNA 决定着生物的性状及性状的多样性，在生物大分子中占有中心位置，这是DNA 的第一个功能。

DNA 通过自我复制能将储存的遗传信息稳定地、忠实地从一代细胞传至下一代细胞，DNA 决定生物性状的延续性与稳定性，这是DNA 的第二个功能。

DNA 的核苷酸序列决定所有细胞内的 RNA 核苷酸序列和蛋白质的氨基酸序列(即所谓"基因表达")，从而体现生物体的生命活动和生命现象。生物的性状往往随生物的生长发育阶段以及生活条件而不同，这与 DNA 中相应的基因表达状况有关，此即所谓的基因表达调控。这是DNA 的第三个功能。

生物的遗传性和变异性同时存在，以适应环境的变化。生物的遗传性是基因稳定性的表现，变异性是基因突变的表现，遗传和变异都是普遍存在的自然现象。在一定范围内的突变是生物产生新的遗传性和新的生物物种所必需的，没有突变就没有生物的进化，生物界就不能前进，所以变异也可以说是DNA 的一个功能。

三、RNA 的结构

核糖核酸是多聚核苷酸中的一种。在蛋白质的合成中几乎都涉及到核糖核酸。RNA 分子是在转录过程中合成的。在转录过程中，通过与DNA 合成相似的机理来产生新的RNA 分子，也就是说RNA 分子是通过互补碱基对形成的，因此RNA 的碱基序列是由DNA 两条链中其中一条链的碱基序列确定的。

RNA 分子与DNA 分子结构上的不同主要表现在以下几个方面：

(1)RNA 中戊糖是核糖，而DNA 分子中戊糖是脱氧核糖。

(2)DNA 分子碱基组成是A、G、C、T，而RNA 中则以U 代替T。另外，一些RNA 分子中的碱基被各种各样的酶(如硫解酶，脱氨基酶)所修饰。

(3)DNA 是由双股多核苷酸链组成的，并以双螺旋形式存在，而RNA 分子则是单股多核苷酸链。由于这种原因，RNA 能围绕自己缠绕，形成独一无二且相当复杂的三维结构。这种结构的形状取决于特定RNA 序列的互补碱基对以及碱基的堆积。RNA 不仅是单股链，而且分子中的碱基比例亦不像DNA 那样遵守查格夫法则，即RNA 分子中的G 和C 不一定相等，A 和U 不一定相等。

RNA 中的三种主要RNA

RNA 分子中最显著的类型是转移 RNA(tRNA)、核糖体 RNA(rRNA)和信使 RNA(mRNA)，还有其他数量较少的RNA，即不均一核 RNA(hnRNA)和小核 RNA(snRNA)。对于 tRNA、rRNA 和 mRNA 的作用可以做个简单的比喻，其中 mRNA 被认为是模板，rRNA 是场所，tRNA 则为运载工具。

1. 转移RNA

tRNA 的主要功能是在蛋白质生物合成过程中作为氨基酸的受体，携带活化的氨基酸到生长中肽链的正确位置，起转移氨基酸的作用。tRNA 约占细胞RNA 的15%。组成tRNA 的核苷酸平均为75 个。虽然大多数蛋白质仅有20 种氨基酸组成，但是在细胞中都至少有五十多种不同的tRNA，每种tRNA 都有自己独特的反密码子三聚体。通常一种氨基酸有一种以上的tRNA，它们之间是同功tRNA。

tRNA 分子的二级结构与三叶草形状相似(图 5-16)。这种形状的形成是由于链内部碱基高度堆积引起的。

tRNA 分子包含有大量的修饰碱基，例如假尿苷、4-硫代尿苷、1-甲基鸟苷、二氢尿核苷。

在tRNA 分子中含有两个重要的结构成分：3-末端和反密码子。这些结构使tRNA 能执行两种重要的功能。3-末端能与特定的氨基酸共价结合，反密码子包含有3 对碱基对序列。在蛋白质合成中，反密码子能与mRNA 中的密码子配对结合。tRNA 分子还含有其他三个重要的结构特点，它们分别是：D 环(二氢尿嘧啶)、TφC 环和可变环(φ是代表假尿苷)。D 环包含有二氢尿嘧啶，TφC 环包含有胸腺嘧啶、假尿苷和胞嘧啶。tRNA 可根据可变环的长度进行分类。大部分tRNA 分子(大约80%)的可变环含有4～5 个核苷酸，而其他tRNA 分子的可变环含有的核苷酸数可达20 个。

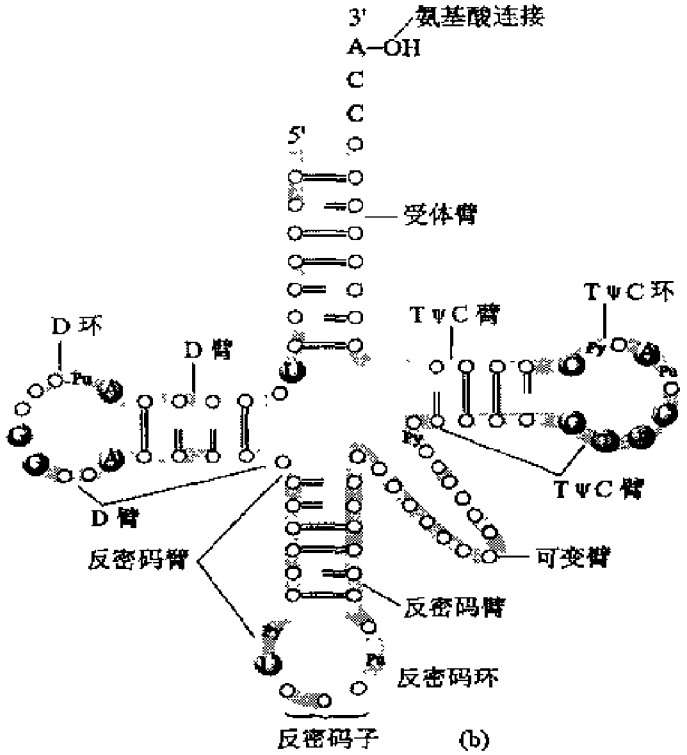


图5-16 tRNA的三级结构

2. 核糖体RNA

rRNA是细胞中含量最多的一类RNA，约占总RNA的80%，它们与核糖体蛋白共同构成核糖体。核糖体是合成蛋白质的细胞质结构(核糖体既含有蛋白质又含有rRNA，因此有时核糖体被称为核蛋白体)。原核生物和真核生物的核糖体在外形和功能上很相似，但它们的大小和化学成分不同。两种类型的核糖体都包含有大小不等的两个亚基，大亚基的大小约是小亚基的两倍。其大小是根据S值来衡量的(S是沉降单位的简写，S的大小代表其在离心机中沉降速度的大小)。原核生物核糖体(70 S)是由一个50 S和30 S的亚基组成的，而真核生物核糖体(80 S)是由一个60 S和40 S的亚基组成的。

在每一种类型的核糖体亚基中可以发现几种不同的rRNA和蛋白质，例如：大肠杆菌的小核糖体中包含16 S rRNA和21多肽；一个典型的大真核生物核糖体亚基包含三种rRNA分子(5 S，5.8 S和28 S)和49多肽，小亚基则包含18 S rRNA和大约30多肽。

3. 信使RNA

mRNA“转录”DNA上的遗传信息并指导蛋白质的生物合成。mRNA约占细胞RNA的5%。各种mRNA分子的大小不同，例如，大肠杆菌mRNA的长度的变化范围是500～6 000个核苷酸。

原核生物和真核生物的mRNA不同，表现在几个方面。首先，许多原核生物的mRNA是多顺反子，即一个操纵子负责的一段转录产物对几条多肽链编码；相反地，真核生物mRNA只为一条多肽链编码，因此被称为单顺反子(顺反子是DNA序列，它包含有多肽的编码信息，同时还包含有核糖体功能所需要的几条信号)。第二，原核生物和真核生物

mRNA 的经历过程不同。原核生物的mRNA 在合成后立即通过核糖体转换到蛋白质中去，而真核生物的mRNA 需要进行修饰，这些修饰包括帽子结构(由7-甲基鸟嘌呤核苷与5-末端残基形成)、不译区和多聚核苷酸尾巴。

4. 不均一核RNA 和小核RNA

在真核细胞中，hnRNA 和 snRNA 起着互补作用。hnRNA 分子是DNA 转录本的最初形式，也是mRNA 的前体。hnRNA 经过剪接作用和修饰，形成mRNA。剪接作用是从初级转录上将基因内区的酶除去。snRNA(即小核RNA 分子，包含90～300 个核苷酸)与几个蛋白质结合可形成小核糖核蛋白颗粒。snRNA 在mRNA 前体的剪接过程以及几种RNA 的形成过程中起作用。

四、RNA 的生物学功能

1. 蛋白质生物合成

蛋白质生物合成是生物体最复杂的事件之一，是由 RNA、蛋白质因子、酶、氨基酸和核苷酸等200 多种生物分子共同参与的，其中最关键的是mRNA、tRNA 和rRNA。mRNA 作为蛋白质生物合成的模板、遗传密码与阅读框架，tRNA 在蛋白质生物合成过程中起接合作用，rRNA 则是蛋白质生物合成的场所。

2. RNA 作为遗传物质

自然界大多数生物都是以DNA 作为遗传物质，但有不少病毒都是以RNA 为遗传物质。例如，某些噬菌体如Qβ、MS2 等，绝大多数植物病毒，六类动物病毒中的第Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ和Ⅵ类以及目前发现的最小植物病原体类病毒都是以RNA 为基因组的。植物病毒及类病毒对某些农作物危害极大。一些RNA 病毒是人类疾病的病原体，其中第Ⅵ类病毒的生活史中有以基因组RNA 为模板合成DNA 中间体的环节，因此又称为逆转录病毒。

3. RNA 也表现催化功能

近年来已发现一些RNA 具有催化自身和其他RNA 分子进行生化转化的能力。RNA 具有催化功能不仅冲击了酶都是蛋白质的传统观念，而且由于RNA 具有自我复制(即催化转移聚合)的活性，也使人们产生了一个新的观念，即RNA 可能是先于DNA 和蛋白质最早在地球上出现的生物大分子。

4. RNA 在基因表达中的调控作用

过去一般的概念是：在原核生物和真核生物细胞中，基因的表达都是通过调节基因密码合成蛋白质来进行调节控制的。但是，近年来，人们已发现，某些调节基因产生的RNA 也具有调控基因表达的作用，这类调节基因称为反义基因，它的表达产物RNA 称为反义RNA。发现反义RNA 的意义有：(1)它可能为肿瘤、病毒以及先天性遗传疾病的防治提供另一条途径；(2)它为癌变机制提供又一种可能的解释。

五、核酸的性质

1. DNA 的性质

(1)DNA 的物理性质　DNA 是双链大分子，它具有以下特性：

a. DNA 的碱基对数为10^3～10^{11}，分子量为10^6～10^{12}，长度为1 μm～10 cm，是具有一定

卷曲度的线性分子，长度与直径比达10^7左右。

b. DNA溶液具有很高的粘度，加热或以其他处理破坏螺旋结构(即DNA分子发生变性)时粘度下降。

c. 具有很大的沉降常数和浮力密度。通常可以采用氯化铯密度梯度离心的办法测出DNA的浮力密度，并可由此测出DNA的G-C含量，区分单链DNA和双链DNA(图5-17)。

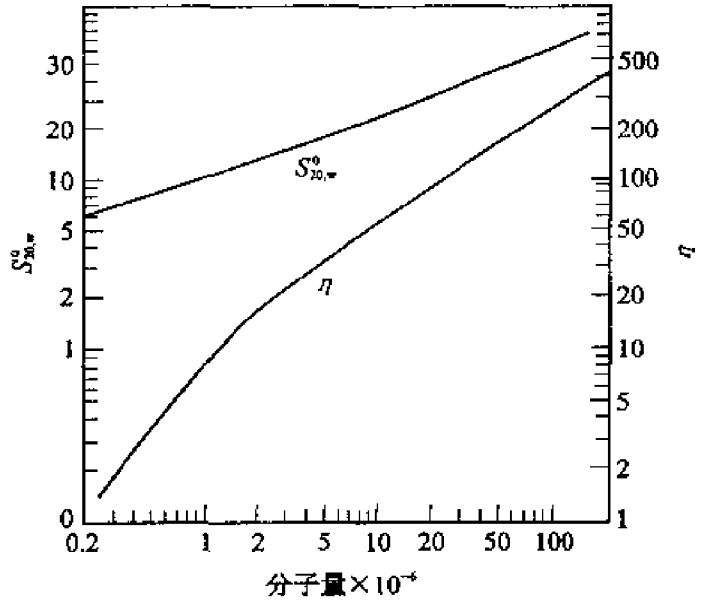


图5-17 DNA分子量和粘度(η)、沉降系数的关系

d. DNA在紫外区具有强的吸收，260 nm吸收最大。利用这种特性可通过260 nm光吸收值测定对核酸进行定量。由于DNA分子太大而且大小不同，很难用摩尔消光系数表示，故通常用克原子磷消光系数[$\in$(P)]计算：

$$\in(P)=A_{260}/C\cdot l \qquad \varepsilon(P)=A_{260}/C\cdot l$$

式中C为每升溶液中磷的克原子数，l为光径。

DNA的$\in$(P)值一般为6 000～8 000，它比其所含的核苷酸单体$\in$(P)值的和要低，降低的程度部分地和双链结构有关。DNA变性，$\in$(P)值升高，表现所谓增色效应；变性后复性，$\in$(P)又恢复至原来水平，称为减色效应。

(2)DNA的解离性质和稳定性　DNA是多核苷酸，是一种多元酸，除了末端磷酸基(pK_1与pK_2分别为1.5与6.0左右)能解离外，磷酸二酯键中的磷酸基也可解离(pK值为1.5)。在通常的DNA抽提溶液中，这些磷酸基全部处于解离状态，因此表现较强的酸性。这种多阴离子状态的DNA可与金属离子成盐，也可与多阳离子如碱性蛋白、组蛋白、亚精胺等结合。

DNA的碱基的pK值一般为3.5～12.0左右，形成核苷酸后酸性解离增强，因此DNA的等电点一般在3左右。

由于DNA的双螺旋结构依赖于碱基对间的氢键促成、维系，而碱基的解离状态又与氢键的形成和稳定有密切关系，因此溶液的pH值直接影响DNA的稳定性。DNA的pH稳定

范围一般为4～11。

(3)DNA 的变性和复性

高温、酸、碱以及某些变性剂(如尿素)能破坏核酸中的氢键,使有规律的螺旋型双链结构变成单链的、无规律的"线团",此作用称为核酸的变性。变性后,核酸的紫外吸收值急剧增加,还发生粘度下降、生物活性丧失等变化。因此,可利用这些性质来判断核酸是否变性。

DNA 的加热变性一般在较窄的温度范围内发生,很像固体结晶物质在其熔点突然熔化的情况,因此,通常把热变性温度称为"熔点"或解链温度(符号 Tm,$T_{1/2}$),在此温度可得到紫外吸收(或其他特性)最大变化的半数值(图5-18)。

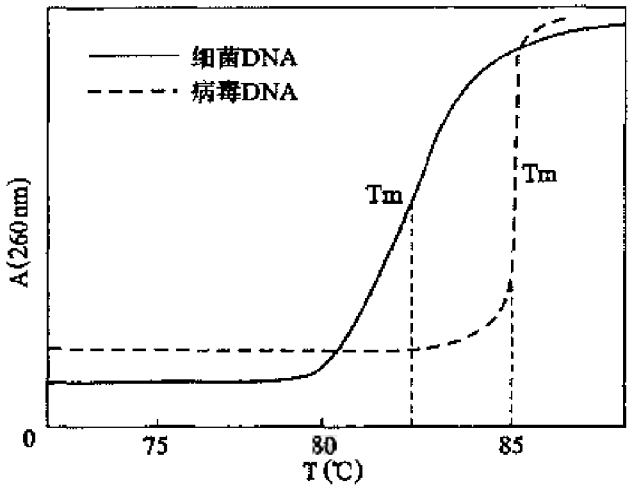


图5-18 DNA 的熔点

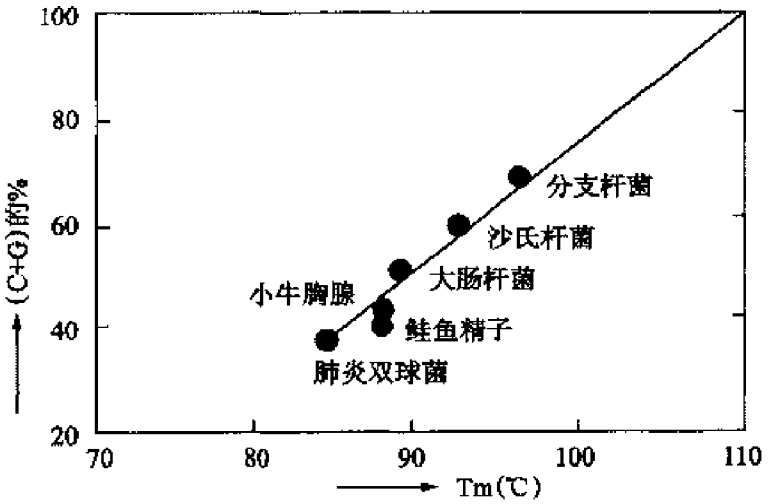


图5-19 DNA 的 Tm 与其 G+C 含量的关系

鸟嘌呤和胞嘧啶含量愈多的 DNA 其 Tm 值愈高,反之则愈低(图5-19)。这是因为G-C碱基对中含3个氢键,而A-T碱基对中只含2个氢键,因而这两类碱基对稳定核酸结构的作用有差别。

DNA 水溶液加热变性时，双螺旋的两条链分开。此时，如果将溶液迅速冷却，两条单链继续保持分开，但是如果缓慢冷却，则两条链可能发生特异的重组合而恢复成双螺旋(图 5-20)。

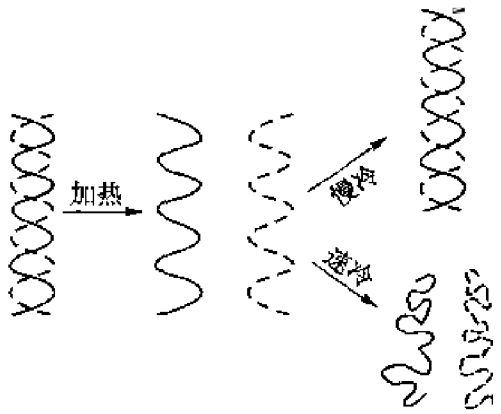


图 5-20　DNA 在溶液中的变性及复性示意图

电子显微镜照片令人信服地证明了这一点。因此，DNA 的变性在一定条件下是可逆的。变性DNA 恢复其原有结构和性质称为“复性”。

仅当缓慢冷却(退火)时才能随着“复性”DNA 的形成而发生螺旋——→线团转变的逆转，因为互补的链首先必须相遇，并在盘绕于一起而形成双螺旋之前将互补区联系起来。相同来源的两个DNA 样品容易通过这种过程形成“杂交分子”，不同来源的DNA 如果彼此间的核苷酸排列顺序互补，也可以形成杂交分子，这种形成杂交分子的过程称为“分子杂交”。分子杂交的技术是研究核酸功能的重要手段。

RNA 变性时发生与DNA 变性时类似的变化，但其变化程度不及DNA 大，因为RNA 分子中只有部分螺旋区。

核酸变性并不涉及核苷酸间共价键的断裂，因而并不引起分子量的降低。多核苷酸链的磷酸二酯键断裂称为降解。DNA 或RNA 变性或降解时其紫外吸收值增加，这种现象叫做增色效应。与增色效应相反的现象称为减色效应。变性核酸复性时发生减色效应。增色效应和减色效应是堆积碱基的电子间相互作用的变化引起的。紫外吸收值的测定简便易行，所以常用核酸溶液紫外吸收值的变化作为变性或复性的指标。

2. RNA 的性质

RNA 和 DNA 一样，都是多核苷酸，而且或多或少都有部分双螺旋结构，因此在物理化学性质上很相似，但也有小的差异，例如：RNA 溶液虽然也有高的粘度，但相对DNA 溶液却小的多；RNA 活力密度比双链DNA 更高，它的∈(P)值也略大，为 7 000～10 000；RNA 同样有变性复性现象，但变性曲线较为平坦，T_m 亦较低，只有 tRNA 由于具有较多的双螺旋区，T_m 相对高些，变化曲线也陡些。

六、核酸的分离

1. 核酸分离的一般程序

(1)破碎

分离核酸的第一步是把它与其他细胞成分解离，使它同结合的蛋白质分离。破碎动物细胞可用方法如下：冷冻和溶化、渗透剧度法、化学试剂，也可使用机械破碎。声波或超声波破碎处理对少量材料的破碎是一个有效的方法。

细菌细胞可以用表面活化剂如十二烷基磺酸钠(SDS)裂解，在适当的细胞中还可用溶菌酶。

(2)分离

细胞破碎和离心除去细胞碎片后，核酸必能从结合的蛋白质上分离出来，之后还可用酚抽提，或用氯仿-异戊醇或氯仿-辛醇反复处理。

在RNA 的分离中，必须注意避免实验材料本身或操作者手指污染的核酸酶造成的降解，因此要用核酸酶的适当抑制剂。在DNA 的制备中，由于螯合剂和SDS 的存在，可以防止二价金属离子激活的脱氧核糖核酸酶引起的降解。相反，可以用纯的核糖核酸酶从DNA 制剂中除去污染的RNA，面RNA 制剂也可以用纯的脱氧核糖核酸酶除去污染的DNA。

(3)纯化

核酸的纯化是根据分子的大小、二级结构和碱基成分的差别进行的。按分子大小分离核酸可以用葡聚糖柱进行凝胶过滤。葡聚糖凝胶有各种型号，选择合适的一种使较小的分子以不同的程度透入凝胶颗粒，而大分子则被排阻在外，迅速通过柱子，因此分子是按照大小递减次序从柱上洗脱下来的。

纯化核酸也可根据二级结构：可用硅藻土甲基化白蛋白柱(MAK)进行纯化，在这个柱上单链DNA 比双链DNA 结合的更牢固；或者用羟基磷灰石(一种晶状磷酸钙)柱纯化核酸，它能保留双链DNA 而允许单链DNA 通过。

利用碱基组分的不同也可以进行提纯。例如，不同tRNA 的碱基比例不同，可用逆流分溶法分离。而碱基组分不同的DNA 浮力密度不同，因而可以用氯化铯密度梯度平衡离心进行分离。

2. DNA 的分离

真核细胞中的DNA 常以核蛋白形式存在。利用核蛋白溶于水或1 mol/L NaCl 的性质，将核蛋白从细胞匀浆中分离出来，再用饱和以水的苯酚等溶剂与上述核蛋白共振，冰冻离心。DNA 溶于上层水相中，而变性蛋白则停留于酚层内。多次反复。将含DNA 的水相合并后加入相当于2.5 倍体积的冷无水乙醇中，可将DNA 沉淀出来。此时DNA 十分粘稠，以玻棒绕成一团，取出。以核酸酶水解以除去RNA。借助密度梯度平衡超速离心法或通过层析法，按DNA 分子的大小和形状分离各种DNA。

3. RNA 的分离

从经过差速离心所得含RNA 的不同细胞器分离各种RNA：从核蛋白体分离rRNA，从多聚核蛋白体分离mRNA，从胞液可以分离tRNA。其分离方法与DNA 的分离法相似。

4. 核酸的纯化

在核酸制剂中，除含核酸外，还有其他含磷物质及含糖物质，因此，必须经过不同溶剂的提取、离心，才能得到核酸的纯品，其流程见图5-21。

5. 核酸组分的分离鉴定

核酸水解产生的4 种一般碱基或核酸可用各种电泳或层析方法进行分离，如纸电泳、胶

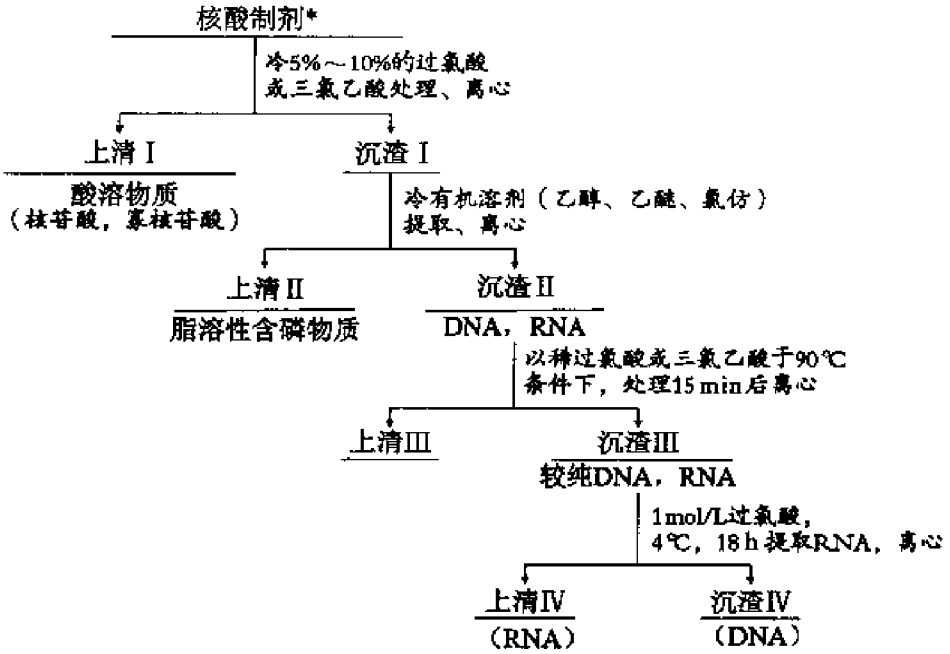


图 5-21　核酸纯化流程

以 1 mol/L NaOH(或KOH)在37 ℃下保温过夜，RNA 被破坏而DNA 不被分解。加入过氯酸或三氯乙酸(最终浓度为5%～10%)酸化后，DNA 即被沉淀出来，离心。上清液含RNA 被解产物。

电泳、纸层析、离子交换层析、薄层层析、反相层析等。修饰组分因含量很低，分离鉴定时常用同位素对核酸进行体内或体外标记，并采用20 世纪70 年代开始发展起来的纤维素双向薄层层析技术，这个方法快速、灵敏且重复性好。

6. 核酸含量的测定

(1)定磷法　将测试标本用浓硫酸或过氯酸消化，使核酸磷转化为无机磷酸。然后，磷酸与钼酸铵反应生成磷钼酸铵，它在还原剂存在下，可被还原生成钼蓝。通过测定无机磷酸测定核酸。

通常RNA 的平均含磷量为9. 4%，而DNA 为9. 9%。这样，可从含磷量推算出核酸含量。

(2)定糖法　在一定条件下，核糖和脱氧核糖分别能与地衣酚、二苯胺产生呈色反应。利用这种特性测定糖量及核酸量。

RNA 与浓盐酸共热则降解，生成的核糖进而转化成糠醛，它与地衣酚反应呈鲜绿色，在670 nm 处呈现最大光吸收。该反应需以 $FeCl_3$ 或 $CuCl_2$ 做催化剂。

DNA 经加热酸解后，水解所得脱氧核糖转变为ω-羟-r-酮戊醛，再与二苯胺生成蓝色物质，在595 nm 处呈现最大光吸收。

RNA 和DNA 在20～200 μg/ml 浓度时，光密度与核酸浓度呈正比关系。

(3)紫外线吸收　该方法是利用核酸组分嘌呤环、嘧啶环具有紫外吸收的特性。用这种方法测定核酸含量时，通常规定在260 nm 下，每毫升含 1 μg DNA 的消光值(即 A_{260})为0. 020，而每毫升含 1 μg RNA 溶液的 A_{260} 值为0. 022。由测得的未知浓度的DNA(或RNA)溶液的 A_{260} 值，即可计算出其中的核酸含量。

第四节　病毒的结构、功能及DNA突变

病毒——曾一度被视为奇物，也许是生命和无生命之间的一种过渡物，现在已经证明它是研究核酸的一个很重要的材料。病毒的遗传信息是由包在蛋白质壳内的DNA或RNA所携带的，病毒外壳保护核酸免受损伤，并使病毒颗粒的潜在侵染性具有特异的宿主范围。大多数细胞，包括植物、动物和细菌细胞都容易受病毒的侵染，侵染细菌的病毒叫做噬菌体。

病毒一旦进入宿主细胞，病毒核酸便能有效地侵染细胞，并最终装配成大量的子代病毒，从宿主细胞中释放出来。在大多数情况下，由于产生这么多的病毒粒子，会导致宿主细胞裂解。在另一种情况下，病毒随宿主细胞的分裂而传给子细胞，引起后代细胞的改变。

一、病毒的结构

当首次从烟草花叶中分离出病毒以后，大量的病毒便被鉴定。病毒的化学分析指出，病毒核酸含量由1%到50%，因病毒而不同，其余几乎全是蛋白质，有些病毒有脂蛋白，表面上的结构简单，实际上掩盖了很大程度的复杂性和掺杂性。由于病毒的起源和进化历程还不清楚，对病毒进行科学归类就很困难。通常，病毒分类是根据在显微镜中观察到的病毒外形（如，弹状病毒有子弹的外形）或者根据病毒的来源即解剖学结构（例如，腺病毒是从腺状体中分离得到的，腺状体是一种淋巴组织）进行的；还可以根据病毒在寄主生物体中产生的症状进行分类（如疱疹病毒引起皮疹）。

简单的病毒粒子是由包围核酸的蛋白衣壳组成的。蛋白衣壳是由叫衣壳粒的蛋白分子相互联结形成的。核衣壳是由蛋白质衣壳和核酸组成的复合物。大部分蛋白质衣壳或者是螺旋状或者是二十面体。病毒的核酸组成可以是DNA，也可以是RNA。虽然大部分病毒含有双链DNA（dsDNA）或者单链RNA（ssRNA），但是有关单链DNA（ssDNA）和双链RNA（dsRNA）的基因组也已被发现。单链RNA（ssRNA）基因组有两种类型：+ssRNA和-ssRNA。+ssRNA具有侵染性，可直接作为mRNA合成蛋白质；-ssRNA没有侵染性，必须依靠病毒携带的转录酶转录成正链之后才能作为mRNA合成蛋白质。

在更复杂的病毒中，核衣壳外面还有一层外套，称为被膜，它是病毒粒子成熟时由寄生细胞包裹成的。由病毒基因编码的被膜蛋白质在病毒装配过程中能插入到被膜中。从被膜表面伸出的蛋白质叫刺突，它可以调节病毒与寄主细胞的结合。

二、病毒的功能

自从19世纪末发现病毒的存在，病毒便引起了生物学家们的广泛兴趣。病毒在大多数疾病中起着重要的作用，病毒研究在极大程度上有利于生物科学的发展。因为病毒能破坏正常宿主细胞的功能产生新的病毒，所以病毒感染可为了解细胞代谢提供依据。例如，动物细胞的感染提供了极宝贵和相对确定的信息，即关于糖基合成蛋白质的机理。另外，在病毒或病毒酶的帮助下，已阐明了几种真核生物的遗传机理，病毒研究也为有关基因的结构及致癌作用方面提供了大量的信息。最后，病毒在DNA重组技术发展方面的作用也是巨大的。

三、DNA 的突变

突变使DNA 结构和功能发生改变，但DNA 结构改变不涉及双链的断开 。DNA 突变因素有如下几个：

(1)核苷酸碱基自发产生酰胺与内酰亚胺互变异构形式

一般情况下，核苷酸碱基是以酮式结构存在，但在特定情况下，分子中的氨基转化为亚氨基，从而使酮式转化为烯醇式。通常互变异构现象对DNA 结构影响不大，但是如果在DNA 复制时发生互变异构，则可能引起碱基的错误配对，如亚氨基形式的腺嘌呤将不与胸腺嘧啶配对，而是与胞嘧啶配对(图 5-22)。

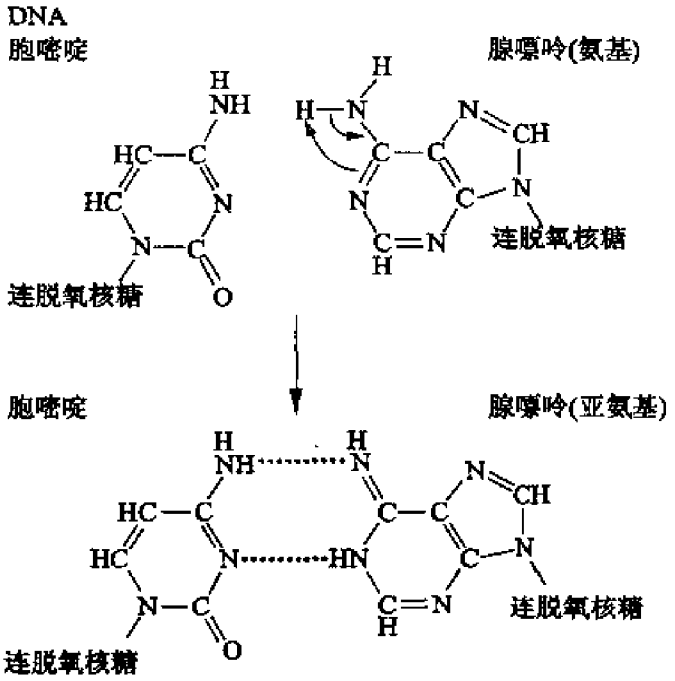


图 5-22　互变异构引起转换突变

如果这种错误的配对没有得到及时的改正，则将引起转换突变(指同类碱基之间的取代)，它属于点突变。点突变是由碱基对的置换引起的，包括转换突变和颠换突变(不同碱基之间的取代)。

(2)核酸的自发水解反应

(3)一些电离辐射：如 UV，X 射线和 γ 射线。低强度辐射引起突变，而高强度辐射将致死。

(4)碱基类似物：如咖啡因与胸腺嘧啶相似。

(5)烷化剂：腺嘌呤和鸟嘌呤更易受亲电试剂(烷化剂)的影响。

(6)非烷化剂：如 HNO_2、$NaNO_2$ 等物质。

(7)插入试剂：如吖啶染料等平面分子。

第五节　基因工程简介

一、基因组

原核生物只有一个染色体，它包括该生物的全套基因，构成该生物的基因组。真核生物的情况比较复杂，能体现正常细胞功能的整套染色体中的全部基因就是真核细胞的基因组。生物随着进化程度的增高，基因组的数值（基因组C值）随之增加，但也有例外。例如：人类是万物之灵，进化程度最高、最复杂，其单倍体基因组的C值为3×10^9bp，而进化程度很低的肺鱼，其C值却有10^{12}bp，所以C值的大小并不能完全说明遗传复杂性的高低。

真核细胞染色体中遗传信息的组织比原核细胞复杂的多，它们的基因组有许多不同的地方。

1. 基因组的大小

真核生物基因组比原核生物大得多。例如，估计大肠杆菌染色体中含有3 000个基因，而人类则是50 000到100 000个。

2. 编码功能

真核生物中大部分DNA序列没有显示出有编码功能（也就是说它们不能确定蛋白质的初级结构）。虽然这些无编码功能的DNA序列的作用是什么还不知道，但是它们可能具有调控作用，尤其是那些所谓的重复序列，这些碎片中含有重复上百次或上千次的短的或中等长度的序列，以串联或散开状态存在于基因中。例如，一组短的以分散方式重复的序列包含300 bp，称为Alu家族，它在人类基因单倍体中重复出现大约有500 000次。

3. 编码的连续性

近年来发现原核生物基因和真核生物基因间有一个基本的不同点。原核生物基因是编码DNA的一个完整片段，而迄今为止分析的大多数真核生物为蛋白质编码的基因都含有“居间顺序”。基因中不编码的居间顺序称为“内含子”，而编码的片段则称为“外显子”，内含子的存在使真核生物基因成为不连续基因或断裂基因。

二、基因工程

基因工程是分子生物学发展中的一个重要领域。自1973年Cohn等人首次在体外将重组的DNA分子形成无性繁殖株以来，仅仅经历20年的时间，有关领域的科学家已能使异源基因在受体细胞成功地表达具有特异生物活性的蛋白质。基因工程技术的迅速发展得益于现代遗传学和生物化学成果的积累和运用，限制性核酸内切酶的发现、对噬菌体和细菌质粒的认识以及Southern转移、聚合酶链反应、脉冲场胶电泳技术等重大发现和技术革新都给基因工程带来新的进展和突破。通过基因工程技术，科学家可以人工地创造新的生物物种，这不仅对生物学的基础理论研究意义重大，而且对工农业生产和医学实践也具有重要的意义。

1. 基因工程概论

所谓基因工程，就是应用酶学的方法，在体外将各种来源的遗传物质——同源的或异源的、原核的或真核的、天然的或人工合成的DNA——与载体DNA 结合成一复制子。这样形成复合分子可以在复制子所属的宿主生物中复制，继而通过转化或转染宿主细胞、生长和筛选转化子，无性繁殖使成为克隆；然后或直接利用转化子，或将克隆的分子自转化子分离后再导入适当的表达体系，使重组基因在细胞内表达，产生特定的基因产物。由外源DNA 插入载体分子所形成的杂合分子又称嵌合DNA。因此，构建这类重组体分子的过程又称分子克隆、基因克隆或重组DNA。

基因工程的基本内容是有目的地对遗传物质功能单位进行综合，创造有价值的生物分子或新的动物、植物和微生物品系。基因工程是通过人工的基因重组和转移，将感兴趣的基因引入宿主细胞，使之在宿主细胞表达有益的蛋白质产物，因此，基因工程技术需要有纯化的特定基因，即目的基因。我们可以通过化学合成法、物理化学法、鸟枪无性繁殖法和酶促合成获得所需的基因。

基因工程的基本过程是基因克隆，即获得重组DNA 的无性繁殖系。外源DNA 离开染色体是不能复制的，如果将外源基因连接到复制子上，该基因便可作为复制子的一部分，在受体菌中复制，这种复制子就是外源基因的载体。常用的基因载体有质粒、噬菌体和病毒。

通过不同途径获取基因、选择或构建适当的基因载体后，基因工程技术的下一步工作是如何将目的基因与载体连接在一起，即DNA 的体外重组。这种DNA 重组是靠T_4DNA 连接酶将适当切割的DNA—目的基因与载体共价连接的。外源目的基因与载体在体外连接成重组体DNA 分子后，需将其导入受体菌进行扩增和筛选，得到大量、单一的重组体分子。这一过程称做外源基因的无性繁殖或克隆。以质粒作载体，将携带外源基因的载体DNA 导入受体细胞的过程称转化。以噬菌或病毒作载体，将携带外源基因的载体DNA 导入细胞的过程称转染或感染。通过转化、转染或感染，重组体DNA 分子被导入受体细胞，经培养得到大量转化子菌落或转染噬菌斑。将重组体从转化子细胞或转染噬菌群体中分离出来，并鉴定无性繁殖的外源基因确实为目的基因，这一过程即为筛选或选择。根据载体体系、宿主细胞特性及外源基因在受体细胞表达情况的不同，可采用直接选择法和非直接选择法。

不论基因工程的研究目的如何，最终均涉及目的基因的表达问题。如研究调控基因结构与机能的关系时，需将天然或人工突变的基因片段插入含一定报告基因的载体的适当部位，将克隆的重组DNA 导入适当活细胞，检测报告基因的表达水平，比较天然和突变基因对表达水平的影响，分析目的基因结构与机能的关系。大多数基因工程研究是以获得目的基因表达产物为目标的。外源基因在受体细胞表达生物活性蛋白质是基于正确的基因转录、有效的mRNA 翻译和适当的转录后、翻译后的加工过程。这些过程的进行在不同的表达体系是不一样的，这种差别不但与基因的来源、基因的性质有关，而且与载体和受体细胞有关。

2. 基因工程技术的应用

(1) 生产蛋白质制品

利用基因工程技术表达和产生蛋白质制品要比传统生产方法优越，表现在如下几个方面：a. 方法经济又简便；b. 适合大量获得目的基因的表达产物；c. 采用基因工程技术产生蛋白质生物制品，可实现常规方法无法解决的生物制备问题。当前，利用基因工程生产蛋白

质制品以微生物为重组DNA 的受体细胞，用发酵法大规模生产。

(2)生物分子结构与功能分析

在当前生物学研究方面，生物学家和遗传学家愈发注重发育生物学或发育遗传学的问题，这关系到基因作用的时间、空间顺序性。基因工程为基因表达调控研究提供了一个重要而有效的手段。基因表达调控是在复制、转录和翻译三个水平上进行的。三级调控过程都离不开核酸、调节因子、酶和激素等生物分子的功能。认识这些生物大分子的结构及其与功能的关系，研究核酸与核酸、核酸与蛋白质及蛋白质与蛋白质之间的相互作用，对揭示基因表达调控规律是十分必要的。

(3)基因工程在医学中的应用

基因工程技术作为早先基因操作的延伸，奠定了分子遗传学的基础，并促进了该领域的发展，而分子遗传学的发展为认识、理解人类遗传病，开拓诊断、治疗新措施开辟了新的前景。

基因工程技术主要包括基因转移技术、反义技术和基因打靶。

①基因转移技术

应用物理、化学或生物学等技术和方法，将外源基因转移到受体菌或细胞内，并使之在细菌或细胞内实现转入基因的扩增和表达，此称基因转移技术，它是重组DNA 技术和基因治疗的关键步骤之一。

自从1970 年Mandel 和Higa 发现经预冷$CaCl_2$溶液处理的细菌可摄入外源DNA 以来，已相继建立了许多将克隆化基因导人原核和真核细胞的方法，如有穿孔法、磷酸钙转染法、脂质体转染法等。20 世纪80 年代后期发展起来的利用病毒载体导入外源基因使之进入哺乳动物细胞的方法，能显著提高基因转移效率，因此，它极大地推动着重组DNA 技术在医学、生物工程、农业、环境保护等领域的广泛应用。

②反义技术和基因打靶

随着DNA 序列分析的发展，人们试图通过封阻或切割基因来关闭基因以改变基因的功能，或者使基因在体外产生定位特异的突变(如缺失、插入或点突变)，并将突变型基因重新导入机体，分析该基因的功能。这是一种“体外诱变”法。由于它与传统的遗传学方法相似，但采用的研究策略相反，因而称为“逆向遗传学”方法。反义技术和基因打靶就是属于这一类方法。

反义技术在分子生物学和细胞生物学中的应用：

a. 基因功能测定

· 细胞增殖和分化有关基因：改变细胞增殖和分化是反义技术的常用目的

· 细胞周期相关基因：细胞周期与细胞增殖密切相关，反义介导对细胞周期的干扰也影响细胞增殖。

· 病毒基因：在多数情况下，反义核酸所选的目标是RNA 转录物或病毒RNA，可用于研究病毒基因的功能。

b. 药物的合理设计

反义策略为发展特异药物治疗病毒或寄生虫感染，或纠正细胞基因(如原癌基因)的异常表达奠定了基础。任何遗传信息都可以是反义寡核苷酸的目标。

- 抑制病毒生产
- 抑制癌基因
- 杀伤寄生虫

基因打靶(转基因模型)在生物医学中的应用

基因打靶技术在生物医学中有广泛的应用，如基因表达调控、转基因动物中该基因产品的制备与动物品种的培养等。

a. 研究代谢过程的调节；

b. 研究动脉粥样硬化和原发性高血压的病因学；

c. 研究胚胎发育；

d. 研究炎症反应机制。

主要参考文献

1 Trudy Mckee, James R. Mckee. 生物化学导论. 北京：科学出版社，2001

2 周润琦，陈石根，李致勋. 生物化学基础. 北京：化学工业出版社，1994

3 沈同，王镜岩，赵邦悌. 生物化学. 北京：人民教育出版社，1981

4 李建武. 生物化学. 北京：北京大学出版社，1990

5 罗纪盛，张丽萍，杨建雄. 生物化学简明教程. 北京：高等教育出版社，2001

6 陈惠黎. 生物大分子的结构和功能. 上海：上海医科大学出版社，1999

7 王镜宝，祁国荣. 核酸结构、功能与合成. 北京：科学出版社，1986

8 哈贝尔斯著. 李宗沂译. 核酸：生化与功能. 上海：上海科学技术出版社，1981

9 [英]戴维森著. 亚当斯等修订. 生物物理研究所二室翻译. 核酸的生物化学. 北京：科学出版社，1983

10 吴鹤龄. 分子遗传学简介. 北京：北京大学出版社，1983

11 曹凯鸣等. 核酸化学导论. 上海：复旦大学出版社，1991

12 张昌颖. 核酸生物化学. 北京：人民卫生出版社，1993

13 姚连生. 郑仲承. 核酸与生命. 北京，科学出版社，1985

14 谢伯泰等. 核糖核酸分子生物学基础. 西安：陕西科学技术出版社，1988

15 王克夷. 生物高分子结构和功能的几个共性. 化学通报，(3)，1982

跋：生物高分子结构和功能的几个共性

塑料、人造纤维和合成橡胶等合成高分子在日常生活中已被人们司空见惯，然而，整个生物界的主要物质基础也是高分子却并非众所周知。生物体合成了多种多样不同结构和功能的生物高分子，离开了这些生物高分子，有机体就不复存在。生物高分子主要有四大类：蛋白质、酶、核酸和多糖。在本书结束之前，再在比较、归纳、总结这几类生物高分子结构和功能的基础上讨论它们的共性，以便对生物高分子的概貌有一总的了解。

一、生物高分子结构上的共性

1. 生物高分子大多是多种单体的共缩聚产物

一种合成高分子通常只含有一种或两种单体，多则也不超过四种，合成方法主要是加成聚合和缩合聚合两种。

生物高分子比较复杂，除了纤维素、淀粉等同多糖只由一种单体组成外，几乎其他生物高分子都含有多种单体，一些细菌的细胞外杂多糖可含有七、八种单糖。核酸中主要单体是四种核苷酸。构成蛋白质的常见单体有20种之多，但也有一些蛋白质往往缺少一种或几种氨基酸。

组成蛋白质和核酸的各种单体这里不再介绍了。多糖的单体主要是葡萄糖、半乳糖和甘露糖等几种己糖以及由它们衍生的氨基糖和糖醛酸，此外还有*L*-岩藻糖和*L*-鼠李糖两种脱氧己糖、*L*-阿拉伯糖和木糖等戊糖。还有一类兼有羧基和氨基的九碳糖——唾液酸（亦称神经氨酸）也是一些多糖的重要组分。这些单糖在多糖链中都缩合成吡喃环或呋喃环，因此同一单糖又可以有两种不同构型：α 和 β。

构成生物高分子的单体几乎都有光学活性。除甘氨酸外，所有构成蛋白质的氨基酸都是*L*型。存在于多糖中的单糖多数是*D*型（上面列举的单糖没有注明的都是*D*型），很少几个是*L*型。核酸骨架中的核糖也是*D*型。

所有生物高分子都不是加聚产物，而可看成是多种单体的共缩聚产物。但这种缩聚在生物体内并不是简单的脱水反应，而是通过一系列复杂的酶促反应来合成各种生物高分子。总的说来，先是单体的活化，然后在酶催化下高分子链逐渐增长。蛋白质中单体是通过肽键相连的，核酸和多糖中单体的连接分别是通过磷酸二酯键和糖苷键。

生物高分子之所以是缩聚产物可能有两个原因。一是生物体内70%左右是水，因此缩合而成的高分子在机体内可通过温和的水解反应进行代谢周转。二是引发加成聚合的自由基或活性离子对生物体是有害的，例如辐射产生的自由基可引起基因突变，诱发不良病变。近年来还有人认为生物体的衰老可能也和自由基有关。

除了简单的生物高分子外，生物体内还存在着复合的生物高分子，如糖蛋白质、脂蛋白、蛋白聚糖等。这些化合物中不同部分之间的连接也是借助于缩合形成的共价键。

生物体合成的脂质类高分子很少，如橡胶和参与糖链合成的多萜醇等都以异戊二烯为结构单元，这些化合物同样也是通过复杂的酶促反应缩合而成的。

生物高分子的结构比合成高分子复杂，功能更是多种多样，其分子基础就在于生物高分子是多种单体的共缩聚产物。单体的种类越多，所构成的高分子的结构就越复杂，功能也就越纷繁。蛋白质的单体种类最多，它们的结构是几类生物高分子中最复杂的，功能也是最多样的。

2. 生物高分子都具有多层次结构

(1)各类生物高分子都有一级结构到高级结构的几个层次

所谓一级结构是指生物高分子中单体的排列顺序。蛋白质中氨基酸排列顺序的测定在不少实验室已是一种常规技术。近年来由于方法学上的突破，核酸一级结构测定进展很快，甚至出现了用测定核酸中核苷酸的顺序来预示相应蛋白质一级结构的趋势。多糖的一级结构测定还比较落后。

对杂多糖来说，一级结构是一个很明确的概念，然而同多糖也有一级结构，这似乎就费解了。同多糖之所以也有单体的排列问题，是因为单糖都有几个可反应的羟基，因此相邻两单糖可以通过不同的羟基而彼此相连；其次同一单糖都有几个可反应的羟基，因此相邻两单糖又有α和β两种不同的构型。纤维素中葡萄糖的连接方式和淀粉一样，都是1→4连接，差别仅在于纤维素是β-葡萄糖的聚合物，而淀粉中的葡萄糖是α-构型。一个羟基的取向不同就使这两种多糖的空间结构、性质和功能完全不同。细菌也能合成葡聚糖，尽管其中葡萄糖也是α-构型，但是主要是1→6连接，因而这种多糖是不同于淀粉的另一种高聚物。不少多糖还具有分支结构，这在蛋白质和核酸中也是极少见的。

多数分子量很大的杂多糖中有一些重复的结构片段，最小的是二糖，大的可由七八个糖基组成。很多蛋白质也有重复的顺序，有的重复片段较短，仅十来个氨基酸，有的长达二十余个残基，更长的也有。蛋白质中相似片段出现的频率很低，一般只有两次，较大的肽链中也可见到四五次。杂多糖中的重复结构是严格相同的，而蛋白质中重复顺序只是相似，不完全相同。出现重复结构的原因：在蛋白质中是基因重复，而在杂多糖中则是糖链合成酶系周而复始作用的结果。

(2)生物高分子的高级结构是指高分子链卷曲而成的三维空间结构

近年来由于X射线衍射技术的发展和完善，很多蛋白质的三维结构已被阐明，有些分子量较小的转移核糖核酸的空间构象也被测定。多糖链空间构象的研究近来也有突破。最近也有人运用电子计算机，结合一级结构研究，来预示蛋白质和多糖的空间结构。

单体排列常常使高分子链在一定范围内可以形成一些特定的规则结构，这就是所谓的二级结构。螺旋是几类生物高分子中最常见的一种二级结构。蛋白质中的α-螺旋几乎都是单股的右手螺旋，脱氧核糖核酸(DNA)中则是双股的右手螺旋，而多糖链既有右手螺旋，又有左手螺旋，有单股螺旋，也有多股螺旋。在蛋白质中还有β折叠、U形转折等其他二级结构的构象单元，在核酸中则有与之相似的发夹结构而多糖链还可呈现带状和皱褶等结构。除上述这些规则结构外，生物高分子也具有无一定规则的结构。1→6连接的多糖链和合成高分子相似，整条链都无规卷曲。在蛋白质和tRNA中局部地也有一些无规结构，但这些结构却不是任意的，所谓"无规"只是相对上述规则构象单元而言。每一种蛋白质中这些"无规"结构实际上都是确定的，同样由蛋白质的一级结构所决定。

二级结构在空间中进一步盘曲折叠就形成三级结构。那些有多种构象单元的生物高分

子的三级结构是二级结构和"无规"结构的总和。所有球蛋白和tRNA 都有这样的三级结构。DNA 和大分子量的核糖核酸(RNA)在形成双螺旋后,还能形成环状或麻花状的三级结构。

近年来,在广泛研究蛋白质空间结构的基础上,有人提出了一些新的结构层次。一是超二级结构,指的是几个相连规则构象单元的组合。另一是结构域,这是指一条肽链卷曲时形成的几个相对独立的区域,它们再进一步组成蛋白质的三维结构。有的蛋白质整个分子就是一个结构域,有的蛋白质则有多个结构域。一些功能相似的蛋白质中常常会有一个或有几个结构域很相似。那些具有重复排列顺序的蛋白质则往往有几个结构域。在tRNA 中可以看到几个小环,似乎和蛋白质的结构域相当。

对蛋白质来说,还有更高一层次的结构——四级结构。有些较大的蛋白质由多条肽链构成,每条肽链作为一个基本单位(称为亚基)通过非共价键聚集成为一个更完整的蛋白质分子。有的蛋白质只有一种亚基,有的则有几种不同的亚基。这种亚基间的相互作用以及由此而形成的特定结构称为四级结构。

对多糖链来说,由于它们的一级结构具有重复性,因此有些结构层次很难严格区分。不少纤维状蛋白也有类似情况,例如整个高分子链都是螺旋构象,它既是二级结构,又是三级结构。但是这类高分子链之间仍可相互作用,例如带状构象的纤维素可堆砌成纤维素束,一些螺旋状蛋白或多糖可形成多股螺旋。

(3)生物高分子除了自身的结构层次外,还可和其他分子相互作用

羧肽酶、胰岛素等蛋白质含有Zn^{2+},血红蛋白中有铁卟啉环。不少酶含有维生素或金属做辅因子。有些核酸和多糖也能和金属结合。多个酶蛋白构成一个酶系,不少蛋白质还可以和核酸相互结合。这种生物高分子与小分子或其他生物高分子的相互作用都有其特定的生理意义。值得一提的是蛋白质等和脂质相互作用,这对形成具有生物活性的生物膜结构特别重要。生物膜可被认为是极其复杂的有机体的最简单、最基本的结构层次——亚细胞器。

(4)以蛋白质为例,上述的生物高分子的层次结构可用图1 来表示。

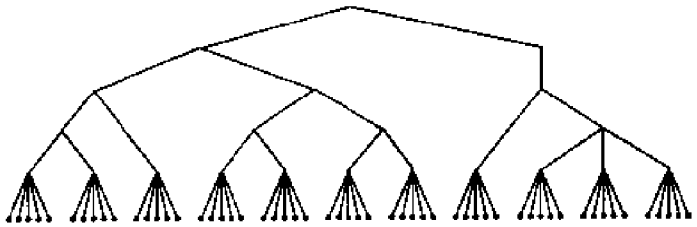


图1　生物高分子结构层次示意图

3. 生物高分子结构的可变性

(1)生物高分子在体内合成后,往往经过某些"加工"才变成具有特定结构和功能的分子。

最早发现一些蛋白水解酶是以无活性的酶原形式被合成的,经切断某些肽键或切去某些肽段而激活。后来陆续发现不少激素和分泌蛋白都有更大的前体。不仅蛋白质,有些核酸也有大分子前体。这些无活性的前体,在体内经剪裁和重组才能变成有生物活性的分子。近年发现糖蛋白上的某些糖链,先是合成由14 个糖基组成的糖链,再转移到蛋白上,而后切去

9 个糖基并接上另外一些单糖，才能成为有功能的糖蛋白。

“加工”的另一种方法是个别单体的化学修饰，例如胶原蛋白中赖氨酸和脯氨酸在蛋白合成后被羟化为羟赖氨酸和羟脯氨酸，而另一些氨基酸则被甲基化或磷酸化等。有些核酸中的稀有碱基也是在高分子合成后经酶促反应修饰而成的。海藻酸等多糖原始合成产物是同多糖，而后在高分子水平上，部分单糖被转变为另一种单糖，从而整个高分子由同多糖变成杂多糖。

第三种“加工”方式是接枝。一些蛋白质和多糖的某些单体上可接上一些糖链、脂肪酸或肽链，变成具有分支结构的复合高分子。有些糖类还能进一步交联成网状结构。

以上三种“加工”方式都有共价键的改变。

(2)生物高分子的层次结构是靠分子内非共价键来维系的。

这些非共价键使分子中多基团不能自由运动。另一些多数在表面的基团因不能参与非共价键的形成，自由度较大，可处于不停的热运动中。有些非共价键可因外来分子或周围环境的影响而改变，从而使生物高分子局部空间构象有所改变。

有时构象改变和生物活性的呈现密切相关。研究的最多的是酶蛋白，在底物等诱导下其空间构象发生改变，有利于催化反应的进行。酶反应的诱导契合学说就是以这种现象为依据的。至今已知的最突出的例子之一是羟肽酶A。当底物的羟基和酶结合部位的145 位精氨酸结合后，分子表面的248 位酪氨酸摆动120°，位移1.2 毫微米，更接近底物中被水解的肽键，终而这一肽键被催化断裂。

别构效应是结构可交性的另一类例证。一些分子作用于生物高分子的一定部位，可引起相距甚远的另一部位空间构象的改变，终而起到调控作用。血红蛋白和氧的结合是了解得最清楚的别构效应的实例。氧和血红蛋白4 个亚基中的第一个结合就削弱了这亚基和其他亚基的相互作用，使其他亚基更易和氧结合。生物体合成某一化合物时，相应的酶系开始运转，一旦此化合物过剩，它本身就作为别构抑制剂，使酶系中某些关键性酶受到抑制，使合成过程中断。近年来发现很多细胞表面的糖蛋白可做外来信息的受体，一般认为首先是携带信息的分子和糖部分结合，然后再把信息传递到细胞内，而在信息传递过程中很可能存在着蛋白部分空间构象的改变。

(3)生物高分子结构的可变性是有限度的，超过一定限度就会引起高分子性质的改变(如溶解度降低等)和活性的丧失，这通常称之为变性。一般说来变性是规则结构的破坏。很多因素可引起生物高分子变性，如热、极端pH、高离子强度、脲等破坏氢键的试剂以及各种表面活性物质。通过适当的途径除去这些因素，可使变性了的高分子恢复到天然构象，并呈现原有活性。很多脲变性的蛋白，可在除去脲后恢复活性。又如热变性的DNA 突然冷却不能恢复天然构象，但慢慢冷却可重新形成双螺旋。多糖的构象的研究却刚刚开始，因此多糖的变性还讨论得很少，但粘胶丝的纺制则是纤维素变性和再次纤维化的过程。

生物高分子结构可变性的各种类型概括地列于表1 中。

表1　生物高分子结构改变的几种类型

类　型			实　质
一级的结构的改变		(1)前体的激活或剪裁重组 (2)一些单体的化学修饰或结构改变 (3)某些单体的侧基上接枝上各种支链	发生在生物高分子生物合成以后。有共价键改变：一些键断裂或形成一些新的共价键
高级结构改变	局部的	(1)一些单体侧基位置的浮动	纯粹的热运动
		(2)活性部位构象改变 (3)别构效应	生物高分子与其他分子相互作用时，局部的非共价键被破坏，重新组合产生一些新的非共价键
	整体的	生物高分子的变性	在一些激烈条件下，整个生物高分子的大量非共价键被破坏

二、生物高分子功能方面的共性

1. 生物高分子作用的专一性

生物高分子在机体内行使多种多样的功能，参与了形形式式的反应。它们行使的功能和参与的反应都有高度专一性。酶——生物催化剂的主要特征之一就是其作用专一性。酶分类和命名原则的依据也在于它们的专一性。作用于不同底物的酶在结构上有很大差别。生物体内另一类蛋白质，它们的基本结构很相似，但却可和结构不同的分子结合。这类蛋白叫做抗体，和它们结合的物质叫抗原。抗体都是同一类的免疫球蛋白，在对应的抗原诱导下"加工"出具有高度专一性的抗体。人的血型是由红细胞表面一些糖链结构所决定的。A 型和B 型的抗原结构几乎相同，差别仅在于同一糖基C_2上的一个取代基，A 抗原上是N-乙酰氨基，B 抗原上则是羟基。在A 型个体的血液中存在着和B 抗原专一结合的抗体，这种抗体可在极复杂的血液中辨认出这样一个取代基的不同，从而导致血球凝集和受血者的死亡。

核酸侧链碱基之间形成的氢键也有专一性。这种专一的碱基配对不仅起到维系和稳定核酸空间构象的作用，而且和核酸、蛋白质的生物合成也休戚相关。DNA 靠了这种专一的碱基配对进行正确无误的自身复制，并通过这种专一的碱基配对DNA 把遗传信息转录到信使核糖核酸(mRNA)上。把遗传信息翻译成蛋白质中氨基酸排列顺序则是借助了mRNA 上的三联体密码和tRNA 上反密码之间的识别，这种识别的基础仍是碱基的专一配对。

生物高分子作用的高度专一性犹如锁与钥匙的配对。为什么生物体能制造出这么多配对的"锁"和"钥匙"？这是因为生物高分子是由多种单体组成的。核酸有4 种单体，3 个核苷酸构成1 个密码，决定1 个氨基酸，这样共有 64 个密码，远远超过了蛋白质中常见氨基酸的数目，以至于有些氨基酸对应了几个密码。结构多变，功能纷繁且专一的蛋白质有 20 种单体。胰岛素是最小的蛋白质中的一个，有51 个氨基酸。如果以50 个氨基酸组成一蛋白质为例，可能有20^{50}(即10^{65})种不同一级结构的蛋白质。由此可见蛋白质完全能被制成千万种不同的"锁"和"钥匙"。

近年来科学界对糖类的兴趣越来越大，原因之一是大量事实证明生物体内许多识别过程和糖类有关，诸如细菌和病毒对宿主细胞的粘着、同种细胞聚集形成特定的组织和器官、细胞对外来信息的识别等。糖类之所以能参与多种识别过程，全在于糖类的结构多变。同样

两个相同单体构成的二肽只有一种，而构成的二糖可有 11 种。三个不同单体可构成 6 种三肽，构成的三糖却有1 056 种之多。不难推测，只要用不多几个单糖就可提供成千上万种不同的糖链，并以此作为生物体内专一识别过程中的一方。

2. 生物高分子作用的配合和协调

生物高分子的别构效应说明了生物高分子中各亚基之间或同一分子中几个不同区域之间的相互关系。生物体内的千万种生物高分子更是相互配合，又彼此协调统一。生物体之所以是活的有生命的机体全在子这种协调统一。

生物体内存在许多“流水作业线”，每条“作业线”都有多个生物高分子组成，它们各司其职，又相互配合，共同完成某一功能。生物体所需的能量来源于糖类和脂肪酸的氧化。整个生物氧化过程是几个酶系先后催化的缓慢而充分的“燃烧”，从而大大提高了燃烧热的利用率，只有少部分能量以热的形式释放出来，大部分能量贮藏在三磷酸腺苷的高能磷酸键中备用。在这类“流水线”中每一生物高分子仅做某一专门化的工作，前一个酶作用产物为后一个酶的底物。此种“流水线”以图 2(1)示意。在另一类“流水线”中前一道“工序”制成的“产品”在后一道“工序”中做工具，见图2(2)。在这类体系中，不仅生产过程继续不断，而且“生产”速度越来越快，整个过程中有一放大作用。创伤时血液凝固就属这一类型。以上是两个蛋白质相互配合的例子。

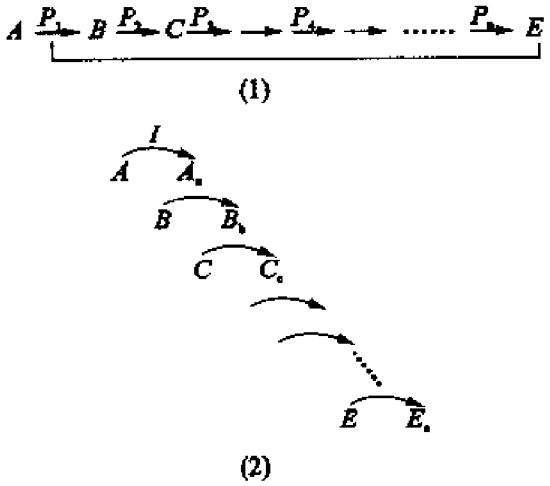


图 2　酶促反应“流水线”示意图

蛋白质生物合成可分为转录、翻译等阶段，全过程则是一个极复杂的调控过程。这全过程有蛋白质、核酸等多种生物高分子参与，目前常用操纵子模型来加以描述。简言之，平时和带有遗传信息的DNA 结合的调节蛋白，在外来因素作用下，从DNA 上脱落下来，DNA 开始转录出 mRNA，后者进入核蛋白体。在伸长因子，氨基酸激活酶，tRNA 等许多蛋白质、核酸和酶的协作下，氨基酸被连接成蛋白质。产物就在生物体内某些部位行使其功能。产物如是酶，就去催化某一反应，这些反应产物中的某些又作为一个信息，使调节蛋白的构象改变重新和DNA 结合，致使转录终止，蛋白质的生物合成也不再进行。引起和终止细胞内蛋白质生物合成的信息往往来自细胞外，接受这些信息的受体则是细胞表面的含糖或含脂质的生物

高分子。

细胞和细胞的相互作用也几乎全是以各种生物高分子的配合为基础的。以受过程为例，精细胞和卵细胞之间专一附着是整个过程的第一步，这种附着由细胞表面的复合糖类与和它们专一结合的蛋白质所承担。附着后，精细胞的顶体释放出多种酶，把卵细胞外周蛋白质和糖类组成的保护层水解掉，至此两种性细胞的质膜得以接触，进而融合为受精卵。同时受精卵表面发生变化，使原来卵细胞表面的受体消失，以免其他精细胞进一步作用。

生物高分子在体内的配合和协调统一非常重要，一旦某一环节发生故障，机体就发生病变。例如人体遗传性地缺乏苯丙氨酸羟化酶系，苯丙氨酸只能脱氨变苯丙酮酸，它在体内不能进一步代谢，部分从尿中排出，相当量则积累在某些脏器内，引起疾病。不少代谢还会影响幼儿智能发育，甚至造成夭折。

总之，生物高分子是具有规则层次结构的缩聚产物，绝大多数生物高分子由多种不同单体组成。它们在行使功能时表现出结构的可变性、作用的专一性，而且各种生物高分子相互配合，协调统一，构成一个活的有机整体，这些都远非合成高分子所能比拟。随着对生物高分子结构和功能方面这些共性的深入了解，就有可能进行生物模拟，从而为合成高分子的研究开拓新的领域。